

**T ZELLDIFFERENZIERUNGSANTIGENE :
IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE CHRONISCHE
T ZELLEUKÄMIE UND DAS ERWORBENE
IMMUNSCHWÄCHESYNDROM (AIDS)**

ALFRED W. A. HAHN

1987

Disbui. München

T Zelldifferenzierungsantigene: Ihre Bedeutung für die chronische

T Zelleukämie

und das erworbene Immunschwächesyndrom (AIDS)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs

Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Alfred W.A. Hahn

aus Weitersburg

Angefertigt am Institut für

Immunologie der Universität

München 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Gutensohn
Sondergutachter: Prof. Dr. E. Winnacker
Prof. Dr. G. Riethmüller
Dr. E. Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.87

	INHALTSVERZEICHNIS	Seite
	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.	EINLEITUNG	3
1.1	Die genetische Basis der Immunglobulinproduktion	4
1.2	Der humane MHC	5
1.3	Modelle zur Antigenerkennung durch T Zellen	7
1.3.1	Biochemische und genetische Beschaffenheit des T Zellrezeptors	8
1.3.2	T Zellmarker und die Immunglobulin-supergenfamilie	9
1.4	Aufgaben- und Fragestellungen	12
2.	ERGEBNISSE	
2.1	Ergebnisse zum T Zellrezeptor einer humanen chronischen T Zelleukämie	15
2.1.1	Charakterisierung des Ausgangsmaterials	15
2.1.2	RNS Präparation	15
2.1.3	Herstellung der cDNA Genbank	17
2.1.4.	Charakterisierung der verwendeten Proben	19
2.1.5	Restriktionskartierung, Klonierstrategie und cDNA Sequenzen repräsentativer Klone	21
2.1.6	Southern- und Northernblotanalysen mit V Genproben	30
2.1.7	Northernblotanalyse auf RNS aus B Zelllinien	35
2.1.8	Expressionsklonierung in pEX Vektoren und Immunisierungsergebnisse	36
2.2.	Ergebnisse zum T Zellmarker CD4	38
2.2.1	Beschreibung der verwendeten Oligonukleotidproben	38
2.2.2	CD4 spezifische cDNA Klone	39
2.2.3	Untersuchungen an EBV transformierten peripheren, ruhenden und stimulierten B Zellen	40
2.2.3.1	Western- und Northernblotanalysen an EBV transformierten B Zelllinien	40
2.2.3.2	FACS Analyse an ruhenden und stimulierten, peripheren B Zellen	43

2.2.3.3	Ergebnisse in der SC ELISA Analyse	45
2.2.3.4	Northernblot Analysen an ruhenden und stimulierten B Zellen unterschiedlicher Herkunft	46
2.2.4	Nachweis CD4 spezifische mRNS in nichtlymphoiden Geweben	49
3.	DISKUSSION	
3.1	Diskussion der Ergebnisse zum T Zellrezeptor	54
3.1.1	Diskussion der Methoden	54
3.1.2	TCR Alpha- und Betakette der Leukämie MF exprimieren bislang unbekannte V Gensegmente	55
3.1.3	Ist die T Zellrezeptor Alphakette ein integrales Membranprotein?	56
3.1.4	Modellvorstellungen zur Antigenerkennung durch T Zellen	57
3.1.5	Die Evolution des Alphalocus	58
3.1.6	Die T Zelleukämie als Modell eines <i>in vivo</i> T Zellklons	60
3.2	Diskussion der Ergebnisse zum CD4 Antigen	62
3.2.1	CD4 Antigenexpression auf B Zellen	63
3.2.2	CD4 Expression auf Zellen nichtlymphoiden Ursprungs	64
3.2.2	Das CD4 Molekül als multifunktionales Protein	65
3.2.3	Alternatives Spleißen von CD4 spezifischer mRNS	66
4.	MATERIAL UND METHODEN	
4.1	Material	70
4.1.1	Zelllinien	70
4.1.2	Monoklonale Antikörper und Seren	71
4.1.3	Chemikalien	71
4.1.4	Radiochemikalien	73
4.1.5	Enzyme	73
4.1.6	Vektoren	74
4.1.7	Bakterienstämme	74
4.1.8	Fotomaterialien	75

4.1.9	Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen	75
4.1.9.1	Bakterienkulturmedien	75
4.1.9.2	Allgemeine Puffer	77
4.2	METHODEN	78
4.2.1	Proteinarbeiten	78
4.2.1.1	Herstellung einer Immunmatrix zur Immunpräzipitation	78
4.2.1.2	Immunpräzipitation und Gelelektrophorese	79
4.2.1.3	Westernblot	81
4.2.1.4	Produktion rekombinanter Fusionproteine	82
4.2.2	Zelluläre Arbeiten	83
4.2.2.1	Separation von Lymphozyten aus Blut	83
4.2.2.2	Zelluläre Immunfluoreszenz	84
4.2.2.3	Zytospinpräparation und ELISA	85
4.2.2.4	Rosettierung von T Zellen und Stimulation von B Zellpräparationen	86
4.2.2.5	Kompetenzinduktion von Bakterien	87
4.2.2.6	Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien	88
4.2.3	Nukleinsärearbeiten	88
4.2.3.1	Präzipitation von Nukleinsäuren	88
4.2.3.2	Phenolextraktion	89
4.2.3.3	Spot Test	89
4.2.3.4	Größenauftrennung von DNS in Agarosegelen	90
4.2.3.5	Elektroelution von DNS Fragmenten	90
4.2.3.6	DNS Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	91
4.2.3.7	Isolierung von DNS	91
4.2.3.8	Plasmidpräparation (Kleinsatz)	91
4.2.3.9	Plasmidpräparation (Großansatz)	92
4.2.3.10	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	93
4.2.3.11	Endmarkierung von Nukleinsäuren	94

4.2.3.12	Southernblot	95
4.2.3.13	Fixierung der DNS von Bakterienkolonien auf Trägerfolien	96
4.2.3.14	Hybridisierung von Zellulosefiltern und Nylonmembranen	97
4.2.3.15	Hybridisierung mit Oligonukleotiden	98
4.2.3.16	Subklonieren in M13 Phagen und Dideoxysequenzieren	98
4.2.3.17	Maxam & Gilbert Sequenzierprotokoll	101
4.2.3.18	Auftrennung von Sequenzierreaktionen	103
4.2.4	RNS Arbeiten	104
4.2.4.1	RNS Isolierung aus Einzelzelluspensionen	104
4.2.4.2	Northernblot	105
4.2.4.3	cDNS Synthese und Klonierung	106
	LITERATURVERZEICHNIS	110
	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	117
	ABKÜRZUNGEN	68
	DANKSAGUNG	
	LEBENSIAUF	

ZUSAMMENFASSUNG

Der T Zellrezeptor von T Zelleukämien nimmt aufgrund seiner Spezifität eine einzigartige Stelle unter den tumorassoziierten Markern ein. Die Analyse der Primärstruktur dieses Rezeptors ermöglicht daher nicht nur die Erfassung neuer V/D/J Genelemente, sondern auch die Beschreibung einer klinisch relevanten tumorspezifischen Struktur. Die Klonierung des in dieser Arbeit beschriebenen T Zellantigenrezeptors einer chronischen T Zelleukämie gelang durch Etablierung einer cDNS Genbank. Sowohl die Alpha- als auch die Betakette enthalten bisher nicht beschriebene Gensegmente. Das V β Genelement gehört zur V β 13 Genfamilie, für die vier Mitglieder vermutet werden, von denen bislang zwei bekannt sind. Das V α Gensegment ist besonders interessant, da es nur als Einzelkopie im Genom vorliegt, aber auf 1% der peripheren T Zellen exprimiert wird. Untersuchungen der beiden T Zellantigenrezeptor Genloci ergaben keinen Hinweis auf zusätzliche Umlagerungen. Eine Störung der Wachstumskontrolle ist nicht über den T Zellrezeptor abzuleiten. Ein weiteres T Zelldifferenzierungsantigen, das CD4 Molekül, ist charakteristisch für die Population der T Helferzellen und bindet an eine monomorphe Determinante auf MHC Klasse II Molekülen. Seine aktuelle Bedeutung liegt in der Tatsache, daß es essentieller Bestandteil des Rezeptorkomplexes für das humane Immundefizienzvirus ist, welches AIDS induziert. Aufgrund der mannigfaltigen klinischen Symptome dieser Erkrankung ist es sinnvoll, das zelluläre Spektrum und die Regulation der Expression des CD4 Moleküls zu untersuchen. Hierzu wurden aus der bereits erwähnten cDNS Genbank CD4 spezifische Klone isoliert und als Sonden im Northernblot auf RNS aus lymphoiden und nichtlymphoiden

Gewebe eingesetzt. Für unstimulierte B Zellen konnte CD4 Expression sowohl auf RNS- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Diese Expression kann durch Stimulation der B Zellen verstärkt werden. Erstaunlicher ist der Nachweis von CD4 spezifischer mRNA in Gliazellen und bestimmten Hirnsubarealen: Thalamus, Kleinhirn, Hippocampus und Pons. Weiterhin konnten zwei alternative CD4 spezifische mRNA Formen nachgewiesen werden: eine zusätzliche 1.7kb mRNA in einem distinkten Kleinhirnareal und nur eine 2kb mRNA in lymphoiden Zellen nach HIV Infektion. Diese Befunde tragen wesentlich zum Verständnis der Pathogenese von AIDS bei und eröffnen darüber hinaus interessante Aspekte zur Multifunktionalität des CD4 Moleküls.

1. EINLEITUNG

Vertebraten besitzen ein Immunsystem, dessen komplexe regulative und effektorische biologische Funktionen man als Immunreaktionen bezeichnet. Sie sind dazu bestimmt die Integrität des Individuums zu bewahren. Als Maxime gilt dabei die Diskriminierung zwischen Fremd- und Eigenstrukturen.

Die fundamentalen Träger dieser Immungeschehen sind die T- und B Lymphozyten deren kooperative Fähigkeiten eine breite Palette von Immunantwortgeschehen zulassen. B Zellen werden im Knochenmark generiert (bone marrow); ihre wichtigste Fähigkeit ist die Bildung von Immunglobulinen (Miller 1962)(Davies 1969). Diese Proteine werden gezielt antigenspezifisch generiert und sind in der Lage gebundenes und freies Antigen zu erkennen, es zu binden, zu neutralisieren oder dessen Eliminierung zu vermitteln.

Der Aufgabenbereich der T Zellen, deren Differenzierung sich im Thymus vollzieht, ist vielfältiger. Sie fungieren einerseits als zentrale Regulatoren, andererseits als periphere Effektorzellen. Hierbei spielen Zell-Zell- Kontakte eine entscheidende Rolle; sei es die Erkennung virusinfizierter Körperzellen seitens zytolytischer T Zellen (Schwartz 1985) oder als Kontakt einer T Helferzelle mit einer B Zelle zwecks Stimulation der Antikörperproduktion (Cantor 1975). Über diese zellvermittelten Funktionen hinaus kommt den von T Zellen gebildeten Mediatorstoffen (Lymphokinen) eine wichtige Steuerfunktion im Immungeschehen zu (Melchers 1976). Sie beeinflussen Makrophagen, Granulozyten und B Zellen gleichermaßen. Die T Zellfunktion allgemein setzt die Expression eines spezifischen Antigenezeptors (Ti/TCR) voraus, der ein direktes Analog zum Immunglobulin der B Zellen darstellt.



Membranständiges, monomeres Immunglobulin, vorwiegend des IgM und IgD Isotyps, wurde relativ schnell als die spezifische Struktur auf B-Zellen erkannt, die der Antigenerkennung dient.

1.1. Die genetische Basis der Immunglobulinproduktion

Der zu erkennenden Antigenfülle seitens der B Zellen hat die Natur eine vielseitige genetische Basis in Form von variablen (V), Diversitäts- (D), Verbindungs- (J) und konstanten (C) Genelementen entgegengestellt (s. Abb.1). Diese können je nach Bedarf und Antigencharakter aus einem Keimbahnrepertoire frei miteinander kombiniert werden (Rearrangierung) (Honjo 1978) (Kataoka 1980) und so zur Bildung antigenspezifischer Antikörper benutzt werden. Dieser und der darauffolgende Mechanismus der somatischen Variation durch Hypermutation (Bernard 1978) eröffnet ein Diversitätsrepertoire von über einer Million Kombinationsmöglichkeiten für die unterschiedlichen Immunglobuline.

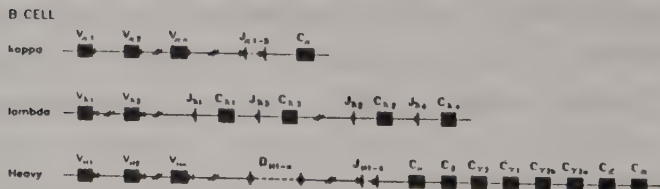


Abb.1: Genomische Organisation der Immunglobulingene
(nach Hood 1986)

Von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Immunregulation ist weiterhin die Tatsache, daß Antikörper auch

gegen die V- Region anderer Immunglobuline gebildet werden können (Jerne 1973). Diese antiidiotypischen Antikörper können die spezifische Immunantwort unter Einbeziehung von T Zellen stimulieren oder supprimieren.

Ist die Aufklärung des B Zellantigenrezeptors über sein entsprechendes Antigen möglich, so ist dies im Falle des T Zellrezeptors nicht machbar. Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dieser Tatsache liefert eine spezifische Eigenschaft des T Zellrezeptors: Antigen wird nur in Verbindung mit individualspezifischen Zellmembranproteinen gesehen. Diese werden durch Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) kodiert (s.Abb.2) (Dausset 1958 und 1965).

1.2.Der humane MHC

Bei den " Selbst"-Strukturen, die als T Zell Erkennungselement dienen, unterscheidet man MHC Klasse I und II Genprodukte. Die Klasse I Genprodukte bestehen aus einer membranverankerten 43 kd schweren, glykosylierten Proteinkette, die nicht kovalent mit einer leichten Kette, dem beta-2 Mikroglobulin verbunden ist (Ploegh 1981). Sie werden beim Menschen von den sogen. HLA- A,B und C- Loci kodiert. Klasse II Genprodukte bilden membranverankerte Glykoproteinheterodimere, die aus einer Alpha- und einer Betakette bestehen (s.Abb.2) und von den HLA- D Loci kodiert werden (Figueroa 1986). Während die Klasse I Genprodukte konstitutiv auf nahezu allen Körperzellen exprimiert werden, sind Klasse II Genprodukte in der Regel nur nach Aktivierung der entsprechenden Zellen exprimiert.

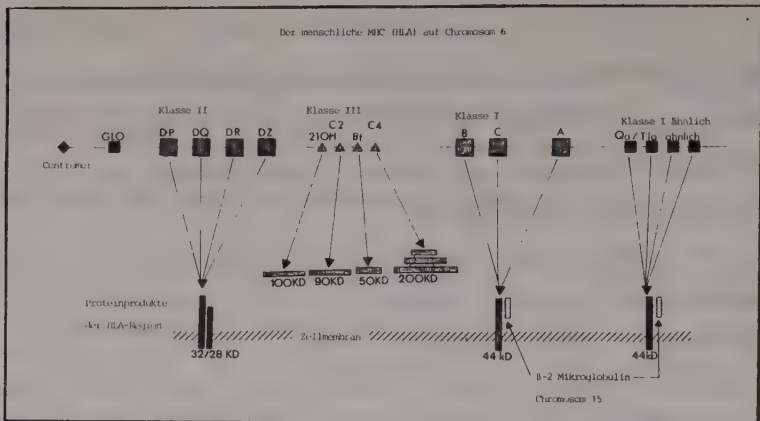


Abb.2: Organisation, Aufbau und Produkte des humanen MHC
(nach Klein 1979)

Die assoziative Erkennung von Antigen und MHC Produkten durch die T Zellen hat sich als zentrales kognitives Prinzip erwiesen und wird als MHC Restriktion (McMichael 1974) bezeichnet. Suppressor /Killer T Zellen benutzen vorwiegend MHC Klasse I Produkte als restringierende Elemente; Helfer/Induktor T Zellen sind hauptsächlich für Klasse II Produkte restringiert. Die assoziative Erkennung sichert dabei, daß T Zellen nicht durch lösliches Antigen permanent stimuliert und/oder blockiert werden. Die MHC Strukturen können in diesem Zusammenhang als Akzeptorstrukturen für Antigene verstanden werden.

1.3. Modelle zur Antigenerkennung durch T Zellen

Basierend auf dem Phänomen der MHC-Restriktion von T Zellen wurden verschiedene Modellvorstellungen bezüglich der Beschaffenheit des T Zell Antigenrezeptors entwickelt. Sie sind in der Abb.3 schematisch dargestellt.

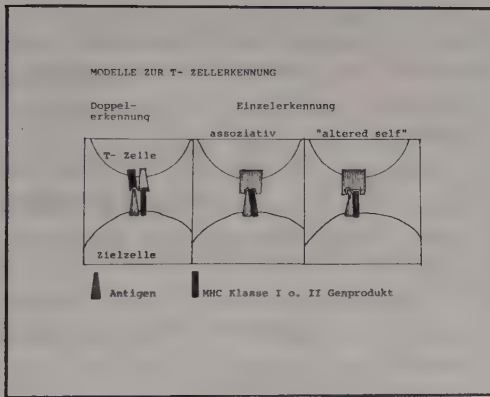


Abb.3: Modelle der Antigenerkennung durch T Zellen

Die Doppelrezeptortheorie besagt, daß für Antigen und Restriktionselement zwei physikalisch getrennte Erkennungsstrukturen verwendet werden (dual recognition) (Blanden 1978). Demgegenüber fordert die Einzelrezeptortheorie einen einheitlichen Rezeptor für beide Erkennungsvorgänge (single recognition) (Pernis 1985). Die Erkennung verläuft dabei entweder assoziativ durch die summative Erfassung von Antigen- und Restriktionselementdeterminanten oder sie geschieht durch das Erfassen von Neodeterminanten, die durch die Kombination von autologem Element und Antigen neu gebildet werden (altered self-Hypothese) (Zinkernagel 1974).

1.3.1. Biochemische und genetische Beschaffenheit des T Zell

Rezeptoren

Aus Erfahrungen mit B Zellen deren Antikörper, sei es als Membranrezeptoren oder als sezernierte Moleküle, einen klonalen Ursprung zeigen; musste dasselbe auch für den T Zellrezeptor gefordert werden. Dies eröffnet die Möglichkeit über T Zellklonierung und Generierung monoklonaler Antikörper gegen diese T Zellklone den individuellen Antigenrezeptor dieses Klones, den sogenannten Klonotypen zu identifizieren (Meuer 1983). Hierbei stellte sich heraus, daß der klonotypische Rezeptor ein Proteinheterodimer von ungefähr 90kd ist, welches aus einer größeren Alphakette (46-49kd) und einer kleineren Betakette (38-44kd) besteht. Beide Glykoproteine sind über eine Disulphidbrücke miteinander verbunden.

Unabhängig von der Charakterisierung klonotypischer T Zellrezeptoren konnte der Rezeptor auch über molekulargenetische Methoden erfasst werden. Die zunächst für die Maus beschriebenen cDNA Klone erfassen Strukturen, die ausschließlich in T Zellen exprimiert werden und das Produkt von Rearrangierungsvorgängen sind, vergleichbar denen von Immunglobulinen (Yanagi 1984) (Sims 1984) (Hedrick 1984).

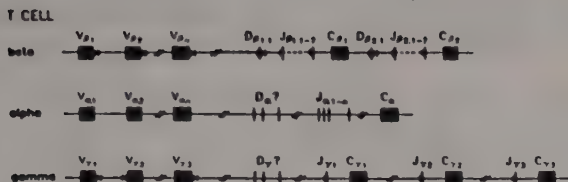


Abb.4: Genomische Organisation und Aufbau der TCR Loci

(nach Hood 1985)

Sie weisen ebenfalls V, D, J und C- Gensegmente auf, die ein, den Immunglobulinen ähnliches rekombinatorisches Potential schaffen. Die drei bislang beschriebenen Gengruppen werden als Alpha-, Beta- und Gammakettengene bezeichnet. Alle zeigen einen homologen Aufbau mit unterschiedlicher, zum Teil noch spekulativer Anzahl von V-, D-, J- und C- Genelementen (s.Abb.4). Innerhalb des T Zellrezeptorkomplexes fehlt noch jede Funktionskorrelation bezüglich des Restriktionsphänomens. Weder die Alphakette, noch die Betakette alleine sind hierfür verantwortlich. Als mitwirkende Moleküle im assoziativen Erkennungsprozess werden auch zwei Zelldifferenzierungsmarker auf T Zellen diskutiert: das CD4 und das CD8 Molekül (Hannum 1984) (Meuer 1984).

1.3.2.T Zellmarker und die Immunglobulinsupergenfamilie

Die Moleküle CD4 und CD8 sind an der Antigenerkennung durch den T Zellrezeptorkomplex zwar beteiligt, aber nicht kovalent mit diesem assoziiert, wie dies für die T Zellrezeptor Alpha- und Betakette beschrieben ist. Es liegt auch keine enge räumliche Assoziation nach Art des CD3 Komplexes vor, der eine

Kopräzipitation von TCR und CD3 Komplex erlaubt (Brenner 1985). Das CD4 Molekül ist ein 56kd schweres Glykoprotein, bestehend aus extrazellulären Domänen, die einen V/J- ähnlichen Aufbau aufweisen (s.Abb.5). Das CD8 Antigen ist ein Glykoproteinheterodimer aus zwei gleichen Ketten mit je 30kd Molekulargewicht. Sie weisen ebenfalls Homologien zu Immunglobulin V- und J- Regionen auf. Aufgrund der Strukturhomologien von Immunglobulinen, T Zellrezeptoren und einigen T Zellmarkern bezeichnet man die für diese Elemente kodierenden Gene auch als Immunglobulinsupergenfamilie (Abb.5) (Hood 1985).

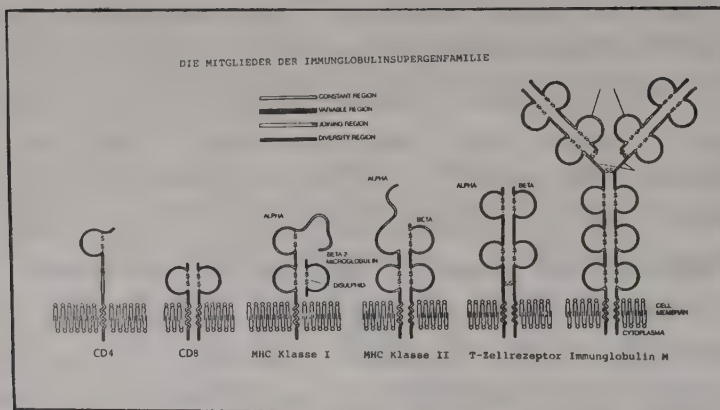


Abb.5: Mitglieder der Immunglobulinsupergenfamilie
(nach Marrack 1986)

Eine sehr enge räumliche und funktionelle Beziehung besteht, wie bereits erwähnt, zwischen dem CD3 Antigen, welches auf allen reifen T Zellen des Menschen vorkommt und dem T Zellrezeptor. Der CD3 Komplex wird als Gamma-, Delta- und Epsilonkette exprimiert und ist nicht kovalent mit der Betakette des T Zellrezeptors verbunden (Gold 1986). Man schreibt diesen drei Glykoproteinen

eine Signaltransduktorrolle ins Zellinnere zu, welche durch den klonotypischen Anteil des T Zellrezeptors (Ti) antigenabhängig gesteuert wird.

Ein T Zellrezeptorkomplex besteht somit zumindest aus sechs mehr oder minder eng miteinander assoziierten Molekülen (s.Abb.6): der Alpha- und Betakette des Ti, dem CD4 oder CD8 Molekül und den drei CD3 Ketten. Dabei ist der Ti-Komplex die antigenerkennende Struktur; CD4 oder CD8 vermitteln die Erkennung einer konservierten, monomorphen Determinante auf MHC Genprodukten und die CD3 Moleküle vermitteln die Signalweitergabe ins Zellinnere, wo eine Kaskade von Aktivierungsvorgängen abläuft, die u.a. die Expression des Rezeptors für den Wachstumsfaktor IL-2 initiiert.

Dem CD4 Molekül als akzessorischer, nicht immer essentieller Komponente eines T Zellrezeptorkomplexes wird jüngst eine weitere wichtige Funktion zugeschrieben, nämlich die des Hauptbestandteils des Rezeptors für das humane T-lymphotrophe Virus Typ III und IV (HTLV III, IV/LAV) jetzt allgemein humanes Immundefizienzvirus (HIV) genannt (Seligman 1984) (Cavaille-Coll 1984). Bestimmte monoklonale Antikörper, die gegen das CD4 Molekül gerichtet sind, sind dabei in der Lage, den Viruseintritt in seine Zielzelle zu blockieren.

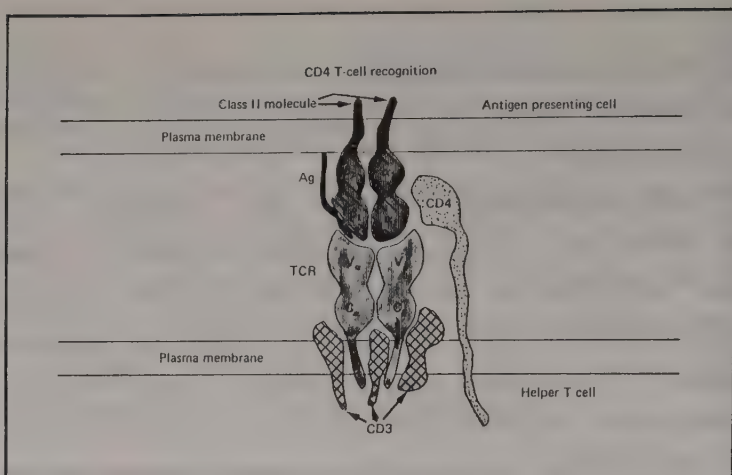


Abb.6: Darstellung eines funktionellen T Zellrezeptorkomplexes
(nach Parnes 1986)

1.4.Aufgaben- und Fragestellungen

Voraussetzung für die molekulargenetische Charakterisierung des Klonotypen einer definierten T Zelle ist die klonale Expansion dieser Zelle. Da erhebliche Probleme bei der *in vitro* Generierung von antigenspezifischen T Zellklonen bestehen, konnten bislang nur wenige Rezeptoren kloniert und sequenziert werden. Um diese Problematik zu umgehen, wurde in dieser Arbeit eine T Zelleukämie als Ausgangsmaterial gewählt. T Zelleukämien stellen in der Regel *in vivo* klonal expandierte T Zellen dar. Durch die Analyse des T Zellrezeptors dieser Leukämie auf Genebene wird nicht nur die Beschreibung neuer V-, D- und J- Elemente ermöglicht, sondern auch das Erfassen einer tumorspezifischen Struktur. Der T Zellrezeptor als tumorspezifisches Element gewinnt zusätzliche Bedeutung durch Beschreibung von Translokationen zwischen Chromosom 8 und 11 mit Chromosom 14, dem Träger des Locus für die T Zellrezeptor

Alphakette (Caccia 1985). Diese Translokationen können den Alphalocus direkt betreffen und zu funktionslosen, hybriden Genprodukten führen (Zech 1983)(Williams 1984). Die molekulargenetische Klonierung des T Zellrezeptors einer Leukämie trägt daher auch zur Klärung des Funktionsverlustes der T Zelleukämie aufgrund abberanter Alphaketten bei.

Die Klonierung und Sequenzierung der Alpha- und Betakette sind Voraussetzung für deren rekombinante Expression in Bakterien. Die Etablierung von Antikörpern gegen das rekombinante Protein würde einen neuen therapeutischen Ansatz zur Leukämiebehandlung darstellen.

Die Tatsache, daß chronische T Zelleukämien über Jahre stabil bleiben ohne eine Behandlung des Patienten zu erfordern, eröffnet die Chance der langfristigen Beobachtung von Regulation und somatischen Vorgängen in den T Zellrezeptorgenen mit *in vivo* Relevanz.

Für CD4 als wichtigem akzessorischem Protein im T Zellrezeptorkomplex konnte gezeigt werden, daß es gleichzeitig ein essentieller Bestandteil des Rezeptors für das humane Immundefizienzvirus (HIV) ist. Klinische und experimentelle Daten zeigen, daß HIV nicht ausschließlich T Zellen, sondern auch Zellen nicht- lymphoiden Ursprungs infiziert. Dies kann als Indiz dafür genommen werden, daß CD4 nicht T Zell exklusiv exprimiert wird. Systematische Untersuchungen des CD4

Expressionspektrums tragen zum einen zu einem besseren Verständnis des komplexen, durch HIV induzierten Krankheitsbildes (AIDS) bei und erlauben andererseits die Erweiterung der Kenntnisse über das Funktionspektrum dieses Moleküls.

2. ERGEBNISSE

2.1. Ergebnisse zum T Zellrezeptor einer chronischen T Zelleukämie

2.1.1. Charakterisierung des Ausgangsmaterials

Zur Etablierung einer cDNA Genbank wurde Blut eines Patienten mit chronischer T Zelleukämie verwendet. Eine Leukämie wurde gewählt, um eine weitestgehend klonale Zellpopulation zur Verfügung zu haben und damit eine indirekte Anreicherung der mRNA eines einzelnen spezifischen Rezeptors. Des weiteren ist eine chronische T Zelleukämie, da sie über Jahre beobachtbar bleibt, ein ideales *in vivo* System um die Stabilität und Konstitution eines T Zellklons zu beschreiben. Immunfluoreszenzanalysen mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene T Zelloberflächenmarker ergaben, daß es sich bei der T- CLL des Patienten M.F. um eine CD4⁺ CD8⁺ Leukämie handelt. Die HLA-Typisierung wurde von Prof. Albert durchgeführt und ergab folgende HLA Klasse I Konfiguration:

HLA- A1,2 ; B8 ; Bw 62; Cw 3

Die leukämischen T Zellen machten etwa 82 % der peripheren Blutlymphozyten aus und etwa 85% der T Zellpopulation. Die Leukozytenzahl betrug 2.5×10^9 pro μl Blut.

2.1.2. RNS Präparation

Als Ausgangsmaterial zur RNS Präparation dienten 20 ml Heparinblut des Patienten. Hieraus wurden durch Ficollseparation 5×10^7 Lymphozyten angereichert. Da es sich bei dieser Zellpopulation

jedoch um eine Mischpopulation aus Makrophagen, B Zellen und T Zellen handelt, wurde eine Anreicherung der T Zellen durch Passagierung der gewonnen peripheren Blutlymphozyten über eine Nylonwollsäule vorgenommen. Makrophagen und B Zellen besitzen die Eigenschaft an das Nylonwollmaterial zu adhäreren, T Zellen hingegen nicht (Greaves 1976). Dies bedeutet, daß man T Zellen nach einer adäquaten Inkubationszeit von Gesamtlymphozyten auf der Nyloensäule nach dem anschließenden Auswaschen im Effluent wiederfindet. Nach zweimaliger Durchführung dieser Säulenadhärenz konnten 2.7×10^7 T Zellen gewonnen werden. Diese Zellen waren zu über 92% CD8 positiv und zu 8% CD4 positiv in der Immunfluoreszenz. Alle Zellen waren Ig negativ. Die Zellen wurden nun zur RNS Isolierung mit Guanidinisothiocyanat als chaotropem Reagenz lysiert (Ullrich 1977) und die Nukleinsäurebestandteile über einen Caesiumchloridgradienten aufgetrennt (Glisin 1974). Die Präparation ergab 150 µg Gesamt- RNS. Davon wurden, nach einer Quantitätsüberprüfung (s. Abb. 7) durch Auftrennung eines Aliquots (10 µg) in einem denaturierenden Gel, 50 µg in der cDNA Synthese eingesetzt. Als Proben im Northernblot wurden die unter Kapitel 2.1.4 beschriebenen cDNA Proben für Alpha- und Betaketten eingesetzt. Die Überprüfung dieser RNS im Vergleich zu RNS aus Jurkat (einer T Zelllinie) und Leber zeigte eindeutig, daß keine Degradierung der RNS vorliegt. Für die TCR Alphakette zeigte sich die normale mRNA von 1.6 kb Größe und für die Betakette das normale Transkript von 1.3 kb Länge. Die kürzere 1.3kb Bande im alphaspezifischen Blot für die Jurkat Zelllinie stellt das Transkript eines nicht funktionell rearrangierten Locus dar. Solche "truncated" mRNA Formen werden für die TCR Gene öfter beobachtet, besonders auch in RNS Präparationen aus Thymus, in dem das Rearrangement der TCR Gene stattfindet. Für die Leber ist kein TCR spezifisches Signal zu sehen, diese Zellen sollten auch keine

Umlagerungen von TCR Genen vornehmen und daher auch keine mRNA produzieren.

1 2 3 1 2 3

16Kb
13Kb



T_H1 T_H2

Abb.7: Qualitätskontrolle der RNS der T CLL im Northernblot

1= Jurkat 2= MF 3= Leber

2.1.3. Herstellung der cDNA Genbank

Zur Synthese von cDNA mit Hilfe der RNS abhängigen DNS Polymerase (Reverse Transkriptase) existiert mittlerweile eine Vielzahl von mehr oder minder schwierig durchzuführenden Protokollen. Die angewendete Methode kombiniert die Vorteile zweier Methoden in einem einfachen Versuchsprotokoll. Die Erststrangsynthese wird vorgenommen wie Gubler & Hofmann (Gubler 1983) dies in ihrem Syntheseprotokoll beschreiben. Die Zweitstrangsynthese erfolgte jedoch nicht unter Mithilfe der RNase H, die das RNS Template aus der Erststrangsynthese entfernt, sondern aus Gründen der sichereren und effektiveren Entfernung der RNS Vorlage, nach chemischer Hydrolyse der RNS mit Natronlauge, wie dies bereits

von Okayama & Berg (Okayama 1982) beschrieben wurde. Die Zweitstrangsynthese beschränkte sich somit auf eine einfache Synthesereaktion mit Polymerase I Klenowfragment. Der Verzicht auf die RNase H Methode bedeutet jedoch, daß die erhaltene ds cDNS einer Nuklease S1 Behandlung unterzogen werden muß, um klonierbare cDNS zu erhalten. Dies ist der einzige kritische Punkt der cDNS Synthesereaktion, da Nuklease S1, falls zu aktiv eingesetzt, auch doppelsträngige DNS abbauen kann und nicht nur spezifisch Einzelstrang DNS. In der Synthesereaktion selbst wurde auf eine Zugabe radioaktiver Nukleotide zwecks Kontrolle der Einbaurate von dNTP's in Erst- und Zweitstrangsynthese verzichtet, um einer Zerstrahlung des cDNS Materials vorzubeugen. Die Effizienz der cDNS Synthese musste deshalb in einem Spotttest nach Durchführung der Nuklease S1 Spaltung bestimmt werden. Der Vergleich der aufgetragenen ds cDNS Menge mit den Standard DNS Verdünnungen ergab eine synthetisierte ds cDNS Menge von 900 ng aus 50 µg Gesamt- RNS. Berücksichtigt man nun, daß die Menge an polyA⁺ RNS in einer Gesamt- RNS Präparation zwischen 2-3 % liegt, so bedeutet dies, daß zwischen 60-90% der polyA⁺ RNS in ds cDNS umgeschrieben wurden.

Durch die selektiven Reaktionsbedingungen der S1 Nukleasereaktion wurden einzelsträngige Bereiche der ds cDNS Moleküle entfernt, so daß anschließend nur noch ds cDNS mit glatten Enden vorliegt, welche als Substrat in die homopolymere Tailingreaktion eingehen. Mit Hilfe des Enzyms Terminale Transferase wird in einer zeittitrierten Reaktion eine definierte Anzahl von dCTP Resten an die 3' Enden der ds cDNS angehängt. Die Anzahl sollte im Optimum zwischen 10-20 Cytosinen betragen. Die Anzahl der nach Sequenzieren der cDNS Klone gefundenen Cytosinreste bestätigte die Richtigkeit der gewählten Tailingbedingungen.

Geteilte das cDNS wurde in einen dG₍₁₂₋₁₈₎, geteilten pUC 9 Vektor verpackt, der dem transfizierten Bakterium die Resistenz gegen Ampizillin verleiht. Während der Annealingreaktion bilden das cDNS und Vektor aufgrund komplementärer Basenpaarung stabile Konstrukte. Eine kovalente Verknüpfung der Enden muß nicht vorgenommen werden, da dies automatisch im Wirtsbakterium geschieht. Als Wirtsbakterium diente der E. coli Stamm HB 101. Nach erfolgter Transformation wurde auf Ampizillinresistenz selektioniert.

Zur Herstellung der Genbank wurden 92 ng Vektor und 500 ng cDNS in kompetente Bakterien transformiert. Dies resultierte in einer Kolonienanzahl von ungefähr 1.2×10^6 .

2.1.4. Charakterisierung der zum Screening verwendeten Proben

Wie aus Abb.8 ersichtlich, wurde die cDNS Genbank mit zwei verschiedenen cDNS Proben auf das Vorhandensein von T Zellrezeptor Alpha- und Betakettenklone getestet. Beide Proben wurden von Dr. Tak Mak, Toronto zur Verfügung gestellt (Yanagi 1985) (Yoshikai 1984). Sie enthalten einen Teil der für den T Zellrezeptor der Jurkat T Zelllinie kodierenden cDNS. Beide Proben umfassen den gesamten konstanten Teil, die Transmembranregion, die zytoplasmatische- und die 3' untranslatierte Region der jeweiligen mRNS (Abb.8). Theoretisch hätten Proben, die den untranslatierten Teil der mRNS erfassen zur Auffindung positiver Klone genügt, da dieser Bereich erfahrungsgemäß hohe Genspezifität besitzt. Ein Austesten dieser Proben (beides Pst I Inserts) im Northernblot auf mRNS zeigte normale Bandengrößen für die mRNS der Alpha- (1.6 kb) und Betaketten (1.3 kb) (s. Abb.7).

Organisation der verwendeten T Zellrezeptor c DNA Proben

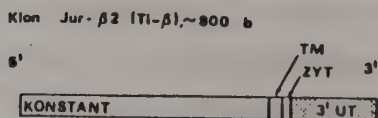
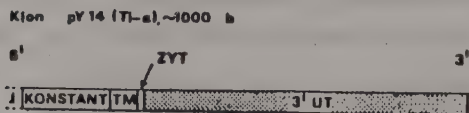


Abb.8: Organisation der TCR spezifischen Proben

pY 14= alphaspezifisch Jur 82= betaspezifisch

2.1.5. Restriktionskartierung, Klonierstrategie und cDNA

Sequenzen repräsentativer Klone

Das Testen der cDNA Genbank mit oben beschriebenen Klonen ergab nach zweimaligem Rescreen eine unterschiedliche Anzahl von positiven Klonen für die Alpha- und Betaketten des TCR. Es konnten elf Betakettenklone und vier Alphakettenklone erhalten werden. Die jeweilige Klonbezeichnung und Insertgröße sind nachfolgend aufgelistet:

Betaketten Klone:

	Insertgröße(kb)
pMF β 2.1	1.2
pMF β 3.1	0.4
pMF β 4.3	1.3
pMF β 5.2	1.2
pMF β 6.3	1.0
pMF β 7.1	0.9
pMF β 8.1	1.3
pMF β 9.1	1.1
pMF β 10.3	0.6
pMF β 11.2	0.8
pMF β 13.3	1.1

Alphaketten Klone:

pMF α 1.1	0.7
pMF α 3.2	1.3
pMF α 3.3	1.2
pMF α 5.3	0.5

Da diese Klone in HB 101 Bakterien vorlagen, die nicht $recA^-$ sind und um ein Umarrangieren der Plasmidinserts in diesen Bakterien zu vermeiden, wurden die Klone in $recA^-$ DK1 Bakterien umklontiert.

Die jeweils größten Klone für Alpha- und Betaketten wurden zur Sequenzanalyse verwendet. Ihre Restriktionskarten und die daraus abgeleitete Klonierstrategie sind in Abb.9 und 12 dargestellt.

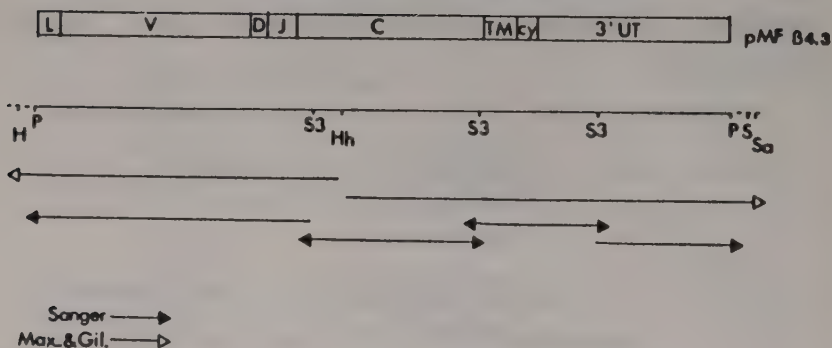


Abb.9: Klonierstrategie und schematische Darstellung des Klon PMF B4.3

H= Hind III, Hh= Hha I, P= Pst I, S= Sma I, S3= Sau 3A, Sa= Sal I

Subkloniert wurde in M13 Phagen nach dem sogenannten "shot-gun" Verfahren. Dazu werden die Inserts mit Sau 3A verdaut und in Bam HI bzw. Bam HI/Pst I geschnittene M13 mp 10 Vektoren kloniert. Alle in einer Thymidin spezifischen Sequenzierungsreaktion als unterschiedlich erkannten Klone wurden ausgewählt und sequenziert (Sanger 1975 und 1977). Schwierigkeiten ergaben sich in der Dideoxysequenzierungsmethode für die Klone, die die jeweiligen

pMF 84.3

L C S L F S P V G R S S E C W C H S D P K
 T G C T G T C A G G C T T T T C T C T G T G G G C A G G T C C A G T G A A T C T G T G T C A C T C A G A C C C A A A
 I P G P E D R T E H D T A V C P R Y V P V I
 A T T C C G G G T C T G A A G A C A G G A C A G C A T G A C A C T G C T G T G T G C C A A G A T A T G A A C A T G G A T
 N V L V S T R P K H G L R L I H Y S V G E
 A C A T G T G C T G G T A T G A C A A G A C C A A C A T G G G C T G A G G C T G A T T C A T T A C T C A G T T G G T G A G G
 G T T A K G E V P D G Y N V S R T K K Q N F
 G T A C A C T C C C A A G G A G A G G T T C C T G A T G C T A C A A T G T C T C C A G A T T A A A A A C A G A A T T T C
 L L G L E S A A P S Q T S V Y F C A S S Y S
 C T G C T G G G G T T G A G A T G G G C T G C T C C C T C C C A A C A T C T G T G T A C T T C T G T G C C A G C A G T A C T C
 A T S V P G P G H Q L T V T E D L N K V F
 G G G A G A G G G T C T T C G G G G G G G A C A C C A C T C A G G T C A G G A G G A C C T G A A C A A G G T G T T C C
 P P E V A V F E P S E A E I S H T Q N A T L
 C A C C G A G G T G C T G T G T T T G A G C A T C A G A G C A G A G A T C T C C A C A C C A A A A G G C C A C A C T G
 V C L A T G I F P D H V E L S W W V N G K E
 G T G T G C C T G G G C A C A G G T A T C T T C C T G A C C A G T G G A G C T G A G C T G T G G G T G A A T G G G A A G G A
 V H S G V S T D P E P L N E Q P A L N D S
 G G T G C A C A G T G G G G T C A G C A G G A C C C C C A G C C C C T C A G G A G C A G C C C C G C C C A A T G A C T C C A
 R Y C L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F
 G A T A C T G C C T G A G C A G C C C C C T G A G G G T C T G G G C A C C T T C T G G C A G A A C C C C C C A A C A C T T C
 R C Q V Q P Y G L S E N N E R T Q D R A K P
 C C C T G T C A A G T C C A G T T C T A G G G G C T C T G G A G A A T G A G A G T G G A C C C A G G A T A G G C C A A A C
 V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S V S
 C G T C A C C A G A T G T C A G C C C C A G G G C T G G G T A G A G C A G A C T G T G G C T T T A C C T C G G T G T C T
 Y Q Q G V L S A T I L Y E I L L G K A T M Y
 A C C A G C A A G G G G T C T G T C T G C C A C C A T C C T A T G A G A T C C T G C T A G G A A G G C C A C C A T G T A T
 A V L V S A L V L H A M V K R K D F End
 G C T G T C T G G T C A G C C C C T T G T G T G A T G G C A T G G T C A A G A G A A A G A T T T C T G A G G C A G C C
 T G A A G T G G A G T T A G G A C T T C T A A C C C G T C A T G T T C A A T A C A C A T T C T T C T T T T G C C A G C C T
 T C T G A A G A C T G C T C T C A C C T C T G C A T C C C A A T A G A T A T C C C C C A T A T G C A T G C A C A C C T G C
 A C A C T C A C C G C T G A A A T C T C C C T A A C C A G G G G A C C T A G C A T G C T A A G T G A C T A A A C C A A T A
 A A A A T G A A A C C T T C C A G A

Abb.10:Nukleotid- und Aminosäuresequenz von pMF 84.3

Pfeile geben die Grenzen der Genelemente an,

Klammern die Akzeptorstellen der Glykosylierung

Homopolymerenden der cDNS enthielten. Die enzymatische Sequenzierreaktion konnte in aufgrund wiederholter Sequenzierfehler keine eindeutigen Daten liefern. Deshalb wurde zusätzlich eine Sequenzierung der Enden der cDNS Klone nach der Maxam & Gilbert Sequenziermethode vorgenommen (s.Klonierstrategie) (Maxam 1977 und 1980).

Der Klon pMF 84.3 enthält die für eine komplette TCR Betakette kodierende Sequenz. Diese reicht vom 3' untranslatierten Ende bis zu den ersten 7 Aminosäuren des Signalpeptids. Somit fehlen das ATG Startkodon und ca. 10 weitere Aminosäuren des Signalpeptids, das die Ausschleusung des synthetisierten Proteinprodukts in das endoplasmatische Retikulum ermöglicht. Die 3' untranslatierte Region und die Sequenzen der konstanten, transmembranen und zytoplasmatischen Bereiche zeigten völlige Homologie zu den bereits veröffentlichten Sequenzen, die sich von der C_α1 Keimbahnsequenz ableiten (s.Abb.10) (Sims 1984) (Yanagi 1984). Die Eruiierung der D- , J- und V- Regionen wurde aufgrund von Sequenzhomologien der D- Region vorgenommen (s Abb.11).

VERGLEICH VON TCR β D ELEMENTEN

pL 4.24						G	C	C	G	A	A	A
YT 35			T	T	C	T	C	G	A	C	C	T
pL 5.7	C	G	T	T		C						
β 4.3	A	G	T	T	A	C	T	C	G	G	C	G
pL 4.16					A	C	T	A	A	T	C	A
pL 3.3	A	G			C	A	C	A				

Abb.11: Vergleich von TCR β D Elementen

Hieraus ergeben sich automatisch die 5' Grenze der J- Region und 3' Grenze der V- Region. Die V Gensequenz ergibt Homologien zur V₁₃ Genfamilie, ist aber unterschiedlich zu den beiden veröffentlichten Sequenzen von zwei Mitgliedern dieser V Familie (Concannon 1986). Für die V₁₃ Familie nimmt man an, daß sie aus vier Mitgliedern besteht. Das V Element des Klon pMF 84.3 kann deshalb als V_{13.3} bezeichnet werden, wobei der Index hinter dem Punkt die Nummer des jeweiligen Mitglieds der V Familie angibt. Die Grenzen der C- Region sind eindeutig durch bereits erfolgte Veröffentlichungen vorgegeben (Yoshikai 1984). Die 5' Grenze der V- Region wurde durch Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz des einzigen offenen Leserahmens im Hydrophobizitätsplot festgestellt. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen für den V/D/J Bereich von pMF 84.3 und YT 35 ist in Abb.14 dargestellt. Trotz der großen Unterschiede in der Proteinsequenz beider V Regionen ist klar erkennbar, daß solche Bereiche, die die strukturgebenden Aminosäurereste enthalten (Cysteine und Glykosylierungsakzeptorstellen) stark konserviert werden, um die Basisstruktur der Rezeptorproteine zu erhalten.

Ein Homologievergleich von D Regionen des D_β1 Klusters ist in Abb.11 wiedergegeben und zeigt, daß die durch D Elemente bedingte N-terminale Diversität einen wesentlichen Bestandteil zur Generierung von Vielfalt darstellt und vermutlich ähnlich erfolgt wie bei den Immunglobulinen (Leiden 1986). Bei den Immunglobulinen werden definierte D Elemente mit definierten V bzw. J Elementen unter zusätzlicher Veränderung durch die Terminale Transferase zusammengebracht, um das funktionelle Produkt zu ergeben. Beim T Zellrezeptor werden die D Elemente ebenfalls durch die Wirkung von terminaler Transferase u.a. Enzyme scheinbar willkürlich verändert um eine Variation auf Proteinebene zu erreichen. Dies ist eventuell nötig, da bei TCR Genen bisher keine zusätzliche somatische Hypervariation beobachtet wird, wie dies für Immunglobulingene beschrieben wird (Eigen 1986). Die B-Zellen sind durch diesen Mechanismus in der Lage, selbst nach erfolgtem Rearrangement der Keimbahnkonfiguration noch adaptive Veränderungen einzuführen, um das Diversitätsspektrum der Immunglobuline zu erweitern.

Die abgeleitete Proteinsequenz der pMF 84.3 Kette enthält zwei Akzeptorstellen für eine N-gekoppelte Glykosylierung und 9 Cysteinreste. Die Cysteine auf Position 29/96 und 146/211 sind wahrscheinlich diejenigen, die die Formierung der Domänenstruktur bewerkstelligen.

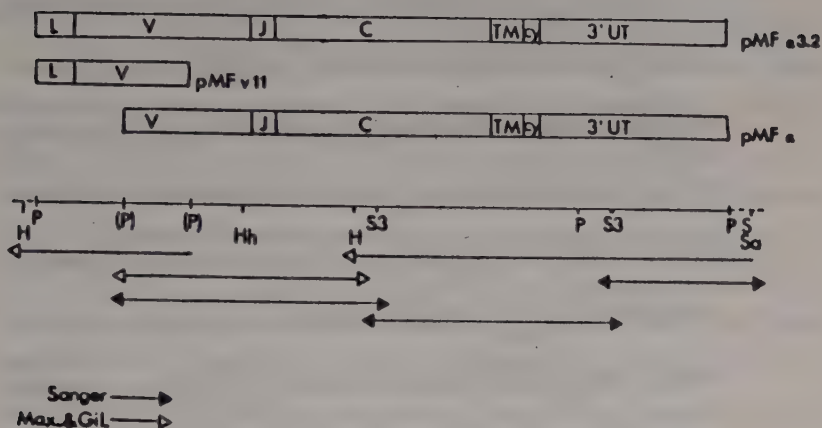


Abb.12: Klonierstrategie und schematische Darstellung

von pMF α3.2

H= Hind III, Hh= HhaI, P= Pst I, S= Sma I, S3= Sau 3A

Sa= Sal I

pH α 3.2

▶1
 L L V V I S A L I V T Y C V F A Q S A T E E 10
 G C T T T T A G T A G T T A T C T G G C T T G A T T G T T A C C T A T T G G T A T T T G C A C A G A G T G G A C T G A A G A
 20 30
 E K K T L D C V T K V E D T L Y W I F Y T
 G G A A A G A G A G C C T T G G A C T G G G T A A G A A G T G G A G G A C A C T T T G T A T T G G A T A T T C T A C A G G C
 40 50
 L T R S S T T P P V T L E T H L L R E H Q R
 T C A C T G G T C A A G C A C A A G G C C T C A G T T A C T C T T G A G A C A C A T C T C T T G A G A G A C A T C A A A G G
 60 70 80
 L H C R P K Q R R D F F P P E E T I C S R R
 C T T C A C T G C A G A C T A A A C A A G G G G A G A C T T C T T T C A C C T G A A G A A A C C A T T T G C T C A A G A A G
 90 100
 K T Q P C I T V S V G R P R I Q D T A P S
 G A A G A C T C A G C A T G T A T T A C T G T G T G C G G G G G G C A G A A T T C A G G A T A C A G A C C C T C A C
 110 120
 P L G G D M L L V S P D I Q N P D P A V Y Q
 C T T T G G A G G G A C A T G C T C T A G T C T C T C A G A T A T C A G A A C C T G A C C T G G G G T G T A C C A G
 130 140
 K R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N
 C T G A G A G A C T C T A A A T C A G T G A C A G T C T G T C T G C C T A T T C A C A G A T T T T G A T T C T C A A A C A A
 150 160
 V S Q S K D S D V Y I T D K T V L D M R S
 T G T G T C A C A A G T A A G G A T T C T G A T G T A T A T C A C A G A C A A A C T G T G C T A G A C A T G A G G T C T A
 170 180
 M D P K S D S A V A R S N K S S D F A C A N A
 T G A C T T C A A G A G C A C A G T C T G T G G C T G G A C A C A A A T C T G A C T T T G C A T G T G C A A A G G C
 190 200 210
 F N N S I I P E D T F F P S P E S S C D V K
 T T C A C A C A G C A T A T T C A G A A G A C A C C T T C T T C C C A G C C C A G A A A G T T C T G T G A T G T C A A
 220 230
 L V E K S F E T D T N L N F Q N L S V I G
 G C T G G T G A G A A A G C T T T G A A C A G A T A G A A C T A A A C T T T C A A A C C T G T C A G T A T T G G G T
 240 250
 F R I L L L K V A G P N L L M T L R L W S S
 T C G A A T C C T C T C T G A A G T G G C G G G T T A A T C T G C T C A T G A G C T G G G C T G T G T C C A G C
 Stop
 T G A G A T C G C A A G A T T G T A A G A C A G C C T G T C T C C C T G C T C T C T C T G C A T T G G C C T C T T C
 T C C T C T C C A A A C A G A G G A C T C T C C A C C C C A A G G A G T G A A G C T G C T A C C A C C T C T G T G C
 C C C C C G C A A T G C C A C C A C T G G A T G G G A T C T A C C G A A T T T A T G A T T A A G A T T G C T G A A G A G C
 T C C A A A C A C T G C T G C C A C C C C C T C T G T T C C T T A T T G C T G C T T G T C A C T G C C T G A C A T T C A C G G
 C A G A G C A A G G C T G C T G C A G C C T C C C T G G C T G T G C A C A T T C C C T C T G C T C C C C A G A G A C T G C
 C T C C G C A T C C C A C A G A T G A T G A T C T T C A G T G G G T T C T C T T G G G C T C A G G C C T G G A G A A T G T
 T G T G A G G T T A T T T T T T A A T A G T G T T C A A A G A A T A C A T A G A T T C T C T C T C A A G A G
 T G G G G G A A A T T A T C T C A T T A T G A G G C C T G C A T G C T G T G C T G G G G T G T T G T A T G T C T G
 C T G G G A T G C C T T C A A A A T G A

Abb.13: Nukleotid- und Proteinsequenz von pH α 3.2

Pfeile geben die Genelemente an, Klammern die

Akzeptorstellen für N- gekoppelte Glykosylierung

Eine vollständige Sequenz für die TCR Alphakette der T-CLL konnte durch die beiden überlappenden Klone pMF α 3.2 und pMF α V 11 erhalten werden. Der Klon pMF α V 11 wurde durch ein nochmaliges Screenen der cDNA Genbank mit einem Subfragment des Klones pMF α 3.2 isoliert, welches den Hauptanteil der variablen Region dieser Alphakettensequenz enthielt. Zu einer vollständigen variablen Region fehlten dem Klon pMF α 3.2 noch wenige Triplets. Auch in diesem Falle wurden die 3'- und 5'-Enden der Klone mit der Maxam & Gilbert Sequenziermethode erhalten. Die Klonierstrategie (Abb.12) und die deduzierte Sequenz ist in Abb.13 wiedergegeben. Auch hier ist die Leadersequenz, die für das Signalpeptid kodiert nicht vollständig. Die Sequenzen für den variablen Teil lassen sich partiell der V α 9 Familie zuordnen (Yoshikai 1986). Der Klon enthält einen 747 bp langen offenen Leserahmen. Vier Akzeptorstellen für eine N-gekoppelte Glykosylierung sind gegeben, wobei sich eine dieser Stellen im Sequenzteil des Transmembranbereiches befindet. Die Tatsache, daß die Alpha- und Betakettenklone keine vollständige Leadersequenz und kein 5'-untranslatiertes Ende aufweisen, läßt sich vermutlich auf nicht optimale Nuklease S1 Reaktionsbedingungen zurückführen.

Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der V/D/J bzw. V/J
Bereiche von pMF beta 4.3 mit VT 35 und pMF alpha 3.2 mit pGA 1/5

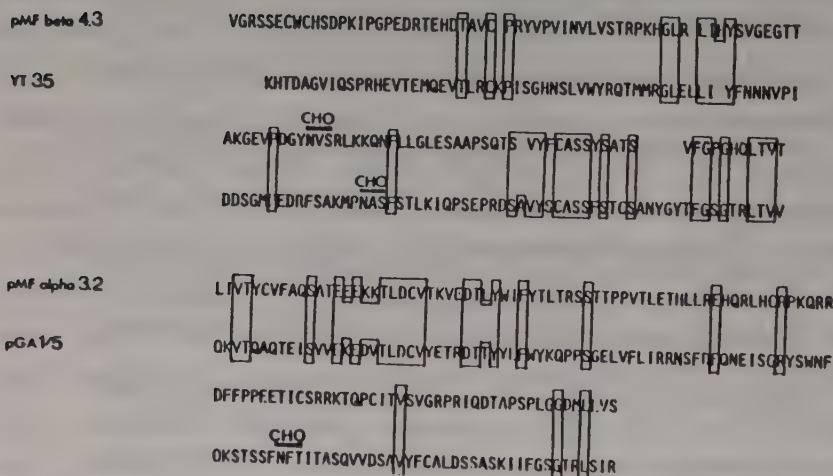


Abb.14 : Vergleich der deduzierten Proteinsequenzen der V/D/J
Bereiche mit Sequenzen der Jurkat T Zelllinie
CHO= Akzeptorsequenz für Glykosylierung

2.1.6. Southern- und Northernblotanalysen mit V α und V β Proben

In einer Southernblotanalyse mit den jeweiligen V Subfragmenten der Klone pMF 84.3 und pMF α 3.2 wurde festgestellt wie die genomische Organisation der jeweiligen V-Fragmente beschaffen ist. Hierzu wurde Leber DNS und DNS der Jurkat T Zelllinie sowie der MF T Zelleukämie mit Eco RI und Bam HI gespalten und mit den Proben der variablen Teile hybridisiert. (Abb.15). Als V β Probe diente ein

Pst I/Hae III Fragment, als V α Probe ein Pst I/Hha I Fragment der jeweiligen Klone. Für die Betakettenprobe ergab sich, daß dieses V- Element mindestens in drei Kopien im Genom vorkommt, die auf drei Eco R I Fragmenten von 3,5 , 9 und 10 kb lokalisiert sind. Für die Alphaketten V- Probe sieht das Hybridisierungsmuster einfacher aus. Man erhält in beiden Enzymverdaus nur jeweils eine Bande. Das Hybridisierungsmuster der Leber DNS, die die Keimbahnorganisation widerspiegelt, zeigt eindeutig, daß dieses V Element in einer einzigen Kopie im Genom auf einem 5 kb Eco RI Fragment vorliegt.

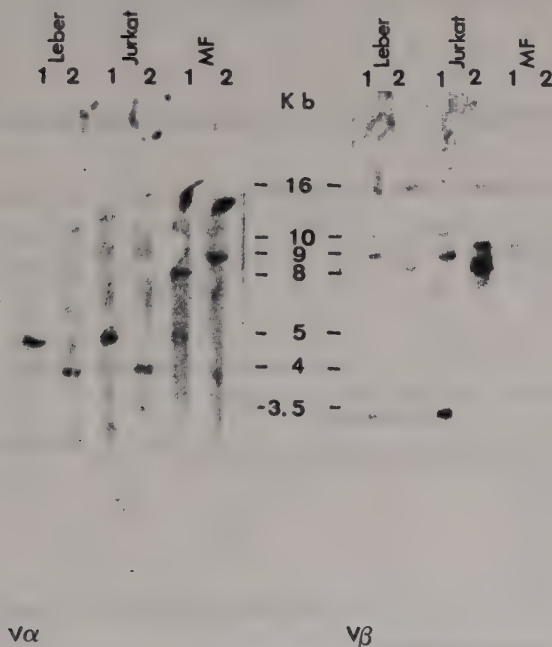


Abb.15: Southernblotanalyse genomischer DNS mit V Genproben

1= Eco RI 2= Hind III

Northernblotanalysen mit den gleichen Proben auf RNS aus Thymus und peripheren Blutlymphozyten zeigen wie häufig die jeweiligen V-Genelemente *in vivo* benutzt werden. Dazu wurden gleiche Mengen Gesamt-RNS aufgetrennt und das letztlich erhaltene Autoradiogramm densitometrisch ausgewertet, um ein objektives Beurteilungskriterium für die erhaltenen Bandenstärken zu haben. Die Ergebnisse sind in Abb.16 dargestellt. Durch den Vergleich der Bandenstärken, die mit den variablen Proben bei achtfach längerer Exponierung auf Röntgenfilm erreicht wurden und den Bandenstärken der gesamten, für T Zellrezeptoren kodierenden mRNS, die durch Hybridisierung mit den konstanten Teilen erhalten wurden, ergab sich die in Tab.I dargestellte rechnerische Verteilung.

SCANNERANALYSE des V α und V β EXPRESSIONSSPEKTRUMS

	GEWEBE		
	Thymus	PBL I	PBL II
V α	0.2%	0.9%	0.8%
V β	1.8%	1.5%	1.0%

Der Scannerwert von C α und C β = 100%
Scannerwert

V α und V β ----- als % von 100
Exponierungszeitunterschied

Tab.I: Rechnerische Verteilung der Expression der V Genelemente in der Scanneranalyse

Die V-Region der Alphakette weist eine auffällig voneinander abweichende Expressionsverteilung zwischen Thymus und Peripherie auf. Im Thymus ist dieses V- Element zu 0.2% repräsentiert, in

peripheren Blutlymphozyten zu 0.9-1.0%. Dieser Befund wird später noch diskutiert werden.

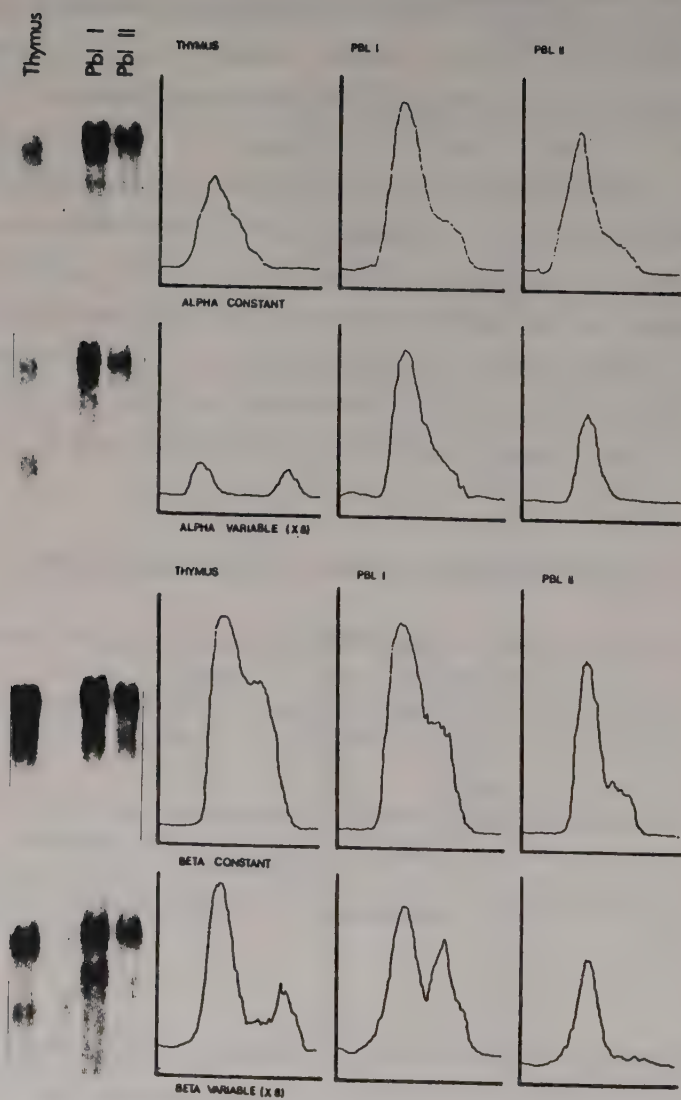


Abb.16: Northernblot mit V und C Genproben der pMF Klone und
densitometrische Auswertung im Scanner

2.1.7. Northernblotanalyse auf RNS aus B Zelllinien

Aus Veröffentlichungen anderer Gruppen ist ersichtlich, daß auch B- Zelllinien die Gene für T-Zellrezeptoren zumindest teilweise rearrangieren können (Yancopoulos 1986). Bisher fehlte noch ein Nachweis, daß diese Rearrangierungsvorgänge auch begrenzt produktiv sind und zur Transkription der Gene führen können. Hierzu wurden mehrere EBV transformierte B- Zelllinien einer Northernblotanalyse unterzogen. Das Ergebnis ist in Abb.17 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß ausnahmslos alle B- Zelllinien eine verkürzte mRNS für die TCR Betakette transkribieren. Diese mRNS für die Betakette überwiegt mengenmäßig die mRNS, die, ebenfalls in verkürzter Form, für die Alphakette nachgewiesen werden kann. Dieser ungewöhnliche, jedoch nicht überraschende Befund stützt die Hypothese, daß T- und B- Zellen ein gemeinsames oder zumindest funktionell sehr ähnliches Rekombinasesystem zur Rearrangierung ihrer Keimbahnsequenzen benutzen (Yancopoulos 1986).

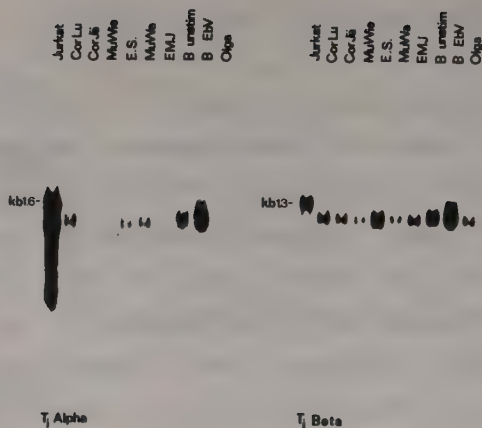


Abb.17: Northernblotanalyse mit TCR spezifischen Proben auf
RNS aus EBV transformierten B Zelllinien

2.1.8. Expressionsklonierung in pEX Vektoren und Immunisierungsergebnisse

Zu Beginn der Konzeptplanung der Klonierung von T Zellrezeptorgenen war die Transfektion von Volle-Länge-Klonen in Maus L Zellen oder P815 Zellen vorgesehen. Der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion kann jedoch nur dann geführt werden, wenn geeignete Reagenzien zum Nachweis bereitstehen. Deshalb bestand ein Ziel darin, gegen TCR Alpha- und Betakettenklone Antiseren zu generieren, um zum einen den Transfektionsnachweis führen zu können und zum anderen eventuell ein therapeutisch einsetzbares Reagenz zu erhalten, aus dem alle Reaktivität gegen monomorphe Bestandteile auf T Zellrezeptorketten absorbiert ist und das ausschließlich gegen die variablen Teile des leukämischen T Zellrezeptors, den Klonotypen einsetzbar ist. Hierzu wurden die

Inserts der Klone pMF 84.3 und pMF α 3.2 im richtigen Leseraster in pEX Vektoren kloniert und gentechnologisch ein TCR/ β -Galaktosidase Fusionsprodukt hergestellt. Mit diesem Fusionsprodukt wurden dann Kaninchen nach folgendem Schema immunisiert:

- je drei Immunisierungen mit 200 μ g Fusionsprotein in komplettem Freund's Adjuvans in 14 tägigem Abstand
- Boosterimmunisierungen mit 200 μ g Fusionsprotein in inkomplettem Freund's Adjuvans im Abstand von 4 Wochen

Die erste Serumabnahme erfolgte eine Woche nach der ersten Boosterimmunisierung. Die Serumreaktivität wurde in der Immunfluoreszenz auf T Zellen und B Zelllinien als Negativkontrolle durchgeführt. Selbst nach mehrfacher Boosterimmunisierung konnte jedoch keine anti T- Zellrezeptorreaktivität beobachtet werden. Um sicherzustellen, daß die anti- TCR Reaktivität nicht auf denaturierte Ketten beschränkt ist, wie dies andere Arbeitsgruppen bereits beschrieben haben, wurden die Seren zusätzlich im Westernblot auf Reaktivität getestet. Auch hier konnte keine anti TCR Reaktion festgestellt werden.

2.2. Ergebnisse zum T Zellmarker CD4

2.2.1. Beschreibung der verwendeten Oligonukleotidproben

Da die beiden T Zellmarker CD4 und CD8 eine bisher noch nicht eindeutig formulierte Rolle im T Zellrezeptorkomplex ausüben und die Möglichkeit bestand Oligonukleotide über Dr. R.Mertz, Genzentrum der Universität München, zu beziehen, beschlossen wir drei verschiedene Oligonukleotide synthetisieren zu lassen, die sich von der von Maddon et al. veröffentlichten cDNS Sequenz eines CD4 spezifischen cDNS- Klonen ableiten (Maddon 1985). Die Sequenzen und Herkunftsregionen der 36^{mer} Oligonukleotide sind in Abb.18 dargestellt. Sie decken den gesamten kodierenden Bereich der cDNS ab und sollten es so ermöglichen aus der bestehenden cDNS Genbank, die ja aus RNS einer T Zellpopulation hergestellt wurde, die noch zu 8% CD4 positive Zellen enthielt, cDNS Klone zu erhalten und deren Vollständigkeit mit den unterschiedlichen Oligonukleotiden getestet werden kann.

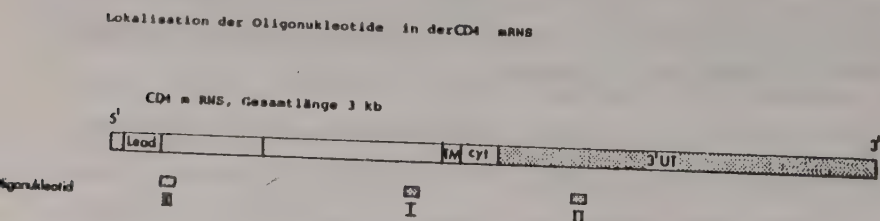


Abb.18: Lokalisation verwendeter 36^{mer} CD4 spezifischer Oligonukleotide

2.2.2.CD4 spezifische cDNS Klone

Durch Screenen der T- CLL cDNS Genbank mit den oben beschriebenen Oligonukleotiden konnten vier cDNS Klone mit unterschiedlichen Insertlängen erhalten werden:

PMF4.3	0.5 kb
PMF4.2	0.7 kb
PMF4.1	1.2 kb
und PMF4.4	1.8 kb

Diese Klone zeigten alle Reaktivität mit dem Oligonukleotid II. Zur endgültigen Absicherung dieses Ergebnisses wurden die ersten drei Klone nach der Maxam & Gilbert Methode ansequenziert und ein Sequenzvergleich mit der veröffentlichten cDNS Sequenz durchgeführt. Für die Klone PMF4.2 und PMF4.3 konnten keine Homologien im sequenzierten Teil gefunden werden, da sie vermutlich den unveröffentlichten Sequenzteil der 3'UT Region der CD4 mRNS enthalten, die beim CD4 mit 1.4kb ungewöhnlich lang ist. Für den Klon PMF4.1 konnte über 70 bp eine 100%ige Homologie zum zytoplasmatischen Anteil der publizierten CD4 Sequenz erhalten werden. Auf eine weiter fortgeführte Sequenzierung des Klons PMF4.1 wurde verzichtet, zumal es durch die erhaltene Sequenz klar schien, daß dieser Klon nur ein kurzes Stück Teilsequenz der kodierenden Region enthielt. Der bislang nur kurz erwähnte Klon PMF4.4 wurde von diesen Untersuchungen ausgeschlossen, da er entgegen der bekannten Fakten zur Restriktionskarte der CD4 spezifischen cDNS eine zusätzliche Pst I Schnittstelle enthielt. Dieser Klon hybridisierte nur mit dem Oligonukleotid II und musste daher entweder nur 3' untranslatierte Region enthalten, die irgendwo im nicht publizierten Teil eine weitere Pst I Schnittstelle enthält, oder aber er stellte ein Artefakt dar. Um nun doch noch einen längeren cDNS Klon zu erhalten wurde eine

zweite cDNS Genbank, die aus Thymozyten hergestellt worden war und freundlicherweise von Dipl.biol. Heike Pohla zur Verfügung gestellt wurde, mit den Oligonukleotiden getestet. Dies ergab einen weiteren cDNS Klon, pMS4.1, der ein größeres Insert hatte, aber interessanterweise auch die interne Pst I Schnittstelle besitzt. Die wiederholt eindeutige Hybridisierung mit den Oligonukleotiden machte ein Artefakt unwahrscheinlich. pMS4.1 reagiert mit Oligonukleotid II, enthält also auch nicht die komplette kodierende Region für das CD4 Protein. Die gewonnenen CD4 spezifischen cDNS Klone wurden in späteren Experimenten als Proben eingesetzt.

2.2.3. Untersuchungen an Epstein Barr Virus transformierten B Zelllinien und peripheren, ruhenden und aktivierten B Zellen

2.2.3.1. Western- und Northernblotanalysen an EBV transformierten B Zelllinien

Die Westernblot Methode ist eine Methode, die die Möglichkeiten der Polyacrylamidgelelektrophorese mit immunochemischen Methoden kombiniert. Hierzu werden Proteine, die in diesem Falle aus einem detergenzhaltigen Zellysat durch Immunpräzipitation gewonnen wurden in einem 15%igen Polyacrylamidgel unter SDS- Beteiligung aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld, das zwischen zwei Kohleplatten erzeugt wird, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und in einer gestaffelten Reaktion mit spezifischen (anti CD4 / anti Mausimmunglobulin) Antikörpern inkubiert und die spezifischen Proteine durch eine Enzym/Substratreaktion sichtbar gemacht. Das Ergebnis einer solchen Untersuchung mit den monoklonalen anti CD4

Antikörpern MT 151 und MT 310 an EBV transformierten B Zelllinien ist in Abb.19 dargestellt. Die stärkste CD4 spezifische Bande ist für das Lysat von Jurkatzellen nachweisbar, einer T Zelllinie, die das CD4 Antigen konstitutiv exprimiert. Die Negativkontrolle mit einer Melanomazelllinie (Mel Juso) weist im Vergleich dazu jedoch keine CD4 Antigenbande auf, wohl aber die Zelllinien RT II, EMJ, SCH und CoJ. Hierbei handelt es sich um B Zelllinien unterschiedlichen Passagealters. Negativ sind die beiden B Zelllinien MuWi und RL; bei den Zelllinien H55 und 5E9 handelt es sich um Hybridome, die ebenfalls CD4 negativ sind. Die Tatsache, daß nicht alle B Zelllinien im Westernblot positive Signale ergeben, ist wohl auf unterschiedlich starke Transkriptionslevel von CD4 in diesen Zellen zurückzuführen. B Zelllinien mit negativem Blotergebnis sind somit unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode. Eine verwaschene Reaktion im oberen Teil des Blots ist auf die Reaktion der peroxidasegekoppelten Antikörper mit hochmolekularen Abbruchprodukten der kovalent gekoppelten Immunmatrixproteine zurückzuführen. Eine Northernblot Analyse der B Zelllinien ist in Abb.20 wiedergegeben und bestätigt die Befunde des Westernblots. Alle B Zelllinien transkribieren eine 3 kb CD4 spezifische mRNA in unterschiedlichem Ausmaß, wobei die Stärke der Transkription mit der Reaktivität im Westernblot korreliert. Als Probe diente der bereits beschriebene cDNA Klon pmF4.1.

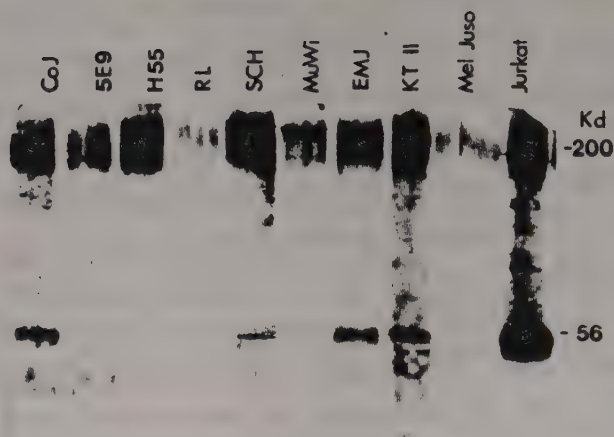


Abb.19: Westernblot mit anti CD4 monoklonalen Antikörpern auf
Lysaten EBV transformierter B Zellen

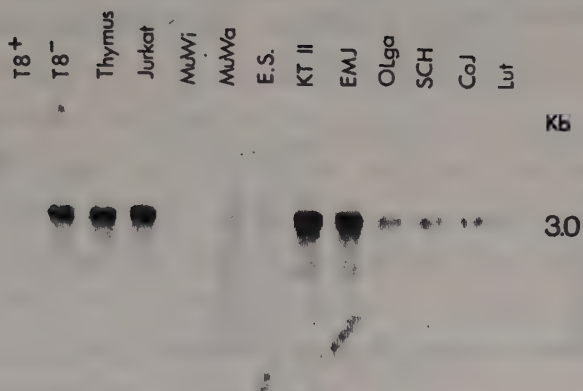


Abb.20: Northernblotanalyse auf RNS aus EBV transformierten B Zelllinien

2.2.3.2.FACS Analyse an ruhenden und stimulierten, peripheren B Zellen

Um reine B Zellpräparationen aus peripherem Blut, Lymphknoten und Milz zu erhalten, wurde eine Präparationsmethode gewählt, die eine äußerst effiziente Abtrennung der B Zellen von anderen Zellen erlaubt. Diese Rosettierungstechnik ist im Material und Methodenteil ausführlich erklärt, ebenso das Protokoll zur Stimulation der B Zellpräparationen.

Ein Aliquot der ruhenden und stimulierten B Zellen aus Normalspenderblut wurde mit Humanserum präabsorbiert, um Bindung an Fc Rezeptoren zu blockieren. Anschließend wurden die

Zellen mit anti CD4 monoklonalen Antikörpern (MT 151/ MT 321) und einem fluoreszeingekoppelten Antiserum markiert und im fluoreszenzaktivierten Zellsorter analysiert. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Abb.21 dargestellt.

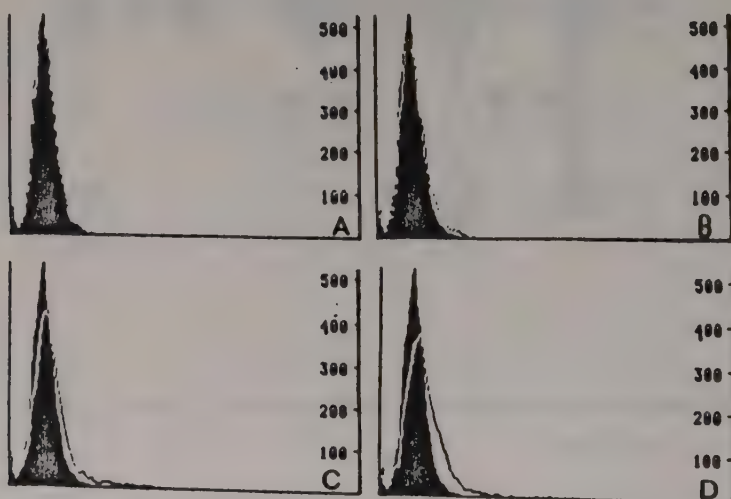


Abb.21: FACS Analyse anti CD4 gefärbter peripherer B Zellen nach Stimulation mit EBV und EBV/TPA

- A) = Antikörperisotypkontrolle auf EBV/TPA stimulierten B Zellen
 B) = anti CD4 gefärbte unstimulierte B Zellen
 C) = anti CD4 gefärbte EBV stimulierte B Zellen
 D) = anti CD4 gefärbte EBV/TPA stimulierte Zellen

Abbildungsteil A) gibt das Reaktionsmuster der Negativkontrolle wieder. Hier wurde ein Mausmyelomprotein gleichen Isotyps (UPC 10) in gleicher Proteinkonzentration eingesetzt. Abb. B) zeigt die anti CD4 Reaktion der unstimulierten B Zellpopulation. Rein rechnerisch liegen hier 6% der Zellen über der Hintergrundreaktion. In Abb. C, die die EBV stimulierte

Zellfraktion zeigt, geben dagegen 16 % der Zellen ein positives Signal. Bei genauer Betrachtung lassen sich zwei Gruppen von Zellen unterscheiden. Eine Population besteht aus schwach gefärbten Zellen. Die zweite Gruppe besteht aus wenigen, stark gefärbten Zellen, die etwa 3% der angefärbten Zellen ausmachen. Unter gleichzeitigem Einfluß von EBV und TPA (ein Phorbol ester, der Zelldifferenzierung induziert und Oberflächenexpression verstärkt) vergrößert sich der Anteil der CD4 exprimierenden Zellen auf 22%. Hiervon werden die stark exprimierenden Zellen jedoch nicht erfasst, es steigert sich lediglich der Anteil der schwach exprimierenden Zellen.

2.2.3.3. Ergebnisse der "single cell" ELISA Analyse von ruhenden und stimulierten peripheren B Zellen

Die "single cell" (SC) ELISA Methode gestattet es, einzelne Zellen auf das Vorhandensein von Zelloberflächenstrukturen mittels monoklonaler Antikörper gegen diese Strukturen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb.22 dargestellt. Sie korrelieren vollständig mit den Resultaten der bereits beschriebenen FACS Analysen. Abb. A zeigt die Färbung resp. Nicht-Färbung der Zellen mit der Antikörperisotypkontrolle. Spezifisch angefärbte, unstimulierte B Zellen geben nur eine schwache anti CD4 Reaktion. Werden dagegen die B Zellen mit EBV oder EBV/TPA stimuliert, vergrößert sich der Prozentsatz CD4 exprimierender Zellen. Deutlich sind einige wenige, stark markierte Zellen zu erkennen. Die übrigen sind entweder schwach oder nicht angefärbt, wobei der Prozentsatz schwach exprimierender B Zellen durch eine zusätzliche TPA Induktion ansteigt. Die Ergebnisse der SC ELISA Versuche betätigen das Vorhandensein von schwach gefärbten Zellen auch in der unstimulierten Zellpopulation (Abb.22 B). Es ist

unklar, ob dieser Befund von *in vivo* Bedeutung ist, da die Zellen unter Umständen bereits eine Stimulation durch die Kulturbedingungen erfahren können.

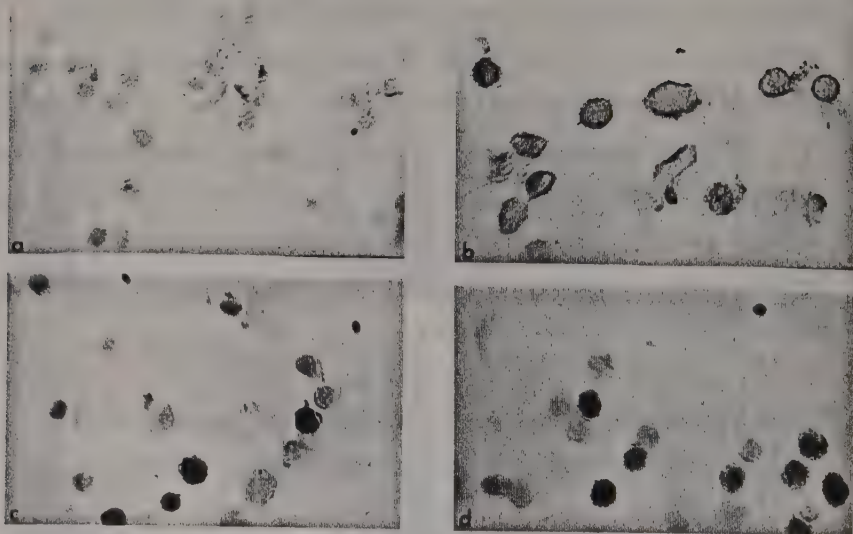


Abb.22: Anti CD4 spezifischer SC ELISA stimulierter und unstimulierter B Zellen

- A) Isotypkontrolle B) unstimuliert C) EBV stimuliert
D) EBV/TPA stimuliert

2.2.3.4. Northernblot Analysen an ruhenden und stimulierten B Zellen unterschiedlicher Herkunft

Zur Absicherung der immunzytochemischen Befunde wurden B Zellpräparationen aus Milz, Lymphknoten und einer noch stimulierbaren B Zelleukämie im Northernblot analysiert. Als Probe zur Detektion CD4 spezifischer mRNS diente der bereits beschriebene cDNS Klon pMF4.1. Für die durch Rosettierung angereicherten B Zellen unterschiedlicher Herkunft ergibt sich ein

ähnlich klares Bild wie dies für EBV transformierte B Zelllinien
gezeigt werden konnte (Abb.23).

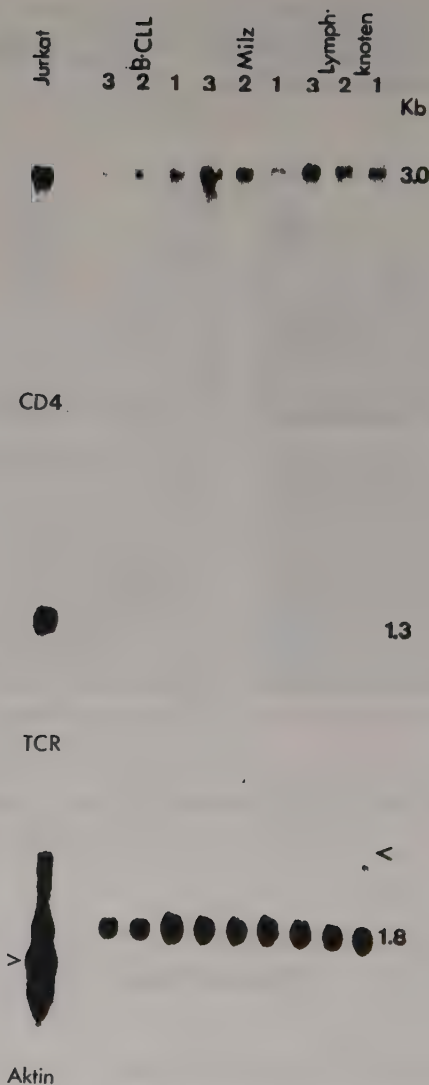


Abb.23: Northernblotanalysen von B Zellen mit CD4-, TCR- und aktinspezifischen cDNS Proben

1= unstimuliert 2= EBV 3= EBV/TPA

Alle Präparationen zeigen die Transkription einer CD4 spezifischen Boten RNS, also auch die der unstimulierten Zellpopulationen. Durch Stimulation der Zellen mit EBV bzw. EBV/TPA wird ein

leichter Anstieg der CD4 spezifischen mRNS bewirkt. Die Kontrollhybridisierung desselben Blots mit einer TCR spezifischen Betakettenprobe (siehe Abb.23 B) zeigt, daß das CD4 spezifische Hybridisierungssignal nicht durch kontaminierende T Zellen verursacht ist. Nur die T Zelllinie Jurkat gibt ein starkes Hybridisierungssignal. Deutlich ist die betakettenspezifische 1.3 kb Bande zu sehen, die die funktionelle TCR Betaketten mRNS repräsentiert. Des weiteren ist noch eine verkürzte mRNS zu beobachten, die das Transkript nicht funktionell rearrangierter Loci darstellt.

Eine weitere Rehybridisierung mit einer aktinspezifischen Probe beweist, daß der Anstieg der CD4 spezifischen mRNS, der über die Stimulationsperiode zu beobachten ist, nicht durch unterschiedliche Mengen analysierter RNS der B Zellpräparationen hervorgerufen ist. Alle Bahnen geben ein Hybridisierungssignal von nahezu gleicher Intensität. Ferner sind noch Restsignale der CD4- und TCR spezifischen Hybridisierung zu sehen (s.Pfeile in Abb.23 C).

2.2.4. Nachweis von CD4 spezifischer mRNS in nichtlymphoiden Geweben

Die enge Korrelation von CD4 Expression und Infizierbarkeit von Zellen durch das humane Immundefizienzvirus (HIV) veranlasste zur Untersuchung des Expressionsspektrums dieses Moleküls. Schon kurz nach der Erstbeschreibung des erworbenen Immunschwächesyndroms (AIDS) und dessen Beziehung zum HIV, wurde das CD4 Antigen als essentieller Bestandteil des Rezeptors für das Virus erkannt (Dalglish 1984) (Klatzman 1984). Diese Erkrankung geht mit vielfältigen klinischen Manifestationen einher und befällt auch das periphere und zentrale Nervensystem. Prä mortal zeigen sich bei

ungefähr einem Drittel der Erkrankten neurologische Symptome und autoptisch finden sich bei mehr als 75% der Verstorbenen neuropathologische Veränderungen, die nur zum Teil durch opportunistische Infektionen erklärbar sind. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß CD4 auch auf Zellen neuroektodermalen Ursprungs exprimiert wird.

Daher wurden einerseits Gliazelllinien auf das Vorhandensein von CD4 mRNS getestet, andererseits mRNS Präparationen diverser Hirnsubareale. Die Ergebnisse der Northernblotanalysen sind in Abb.24 und Abb.25 dargestellt.

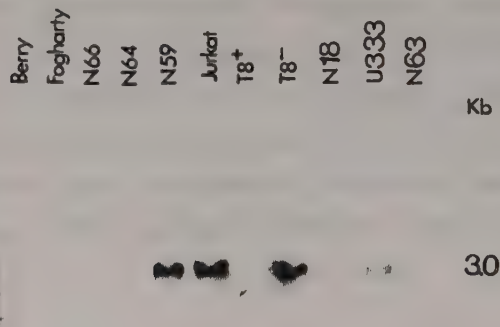


Abb.24: Northernblotanalyse von RNS aus Gliazelllinien mit einer CD4 spezifischen cDNS Probe

Von fünf getesteten Gliazelllinien erwiesen sich zwei als positiv. Dieser Befund war nicht allzu überraschend, da Virus bereits in Astrozyten, einer Gliazellsubpopulation, nachgewiesen werden

konnte (Shaw 1985). Überraschender waren die Befunde bezüglich der Hirnareale. Hier gaben Präparationen von vier anatomisch distinkten Bereichen ein eindeutig positives Signal. Dies sind die RNS Präparationen von Kleinhirn, Thalamus, Pons und Hippocampus. In allen Fällen ist die typische 3kb CD4 spezifische mRNS zu beobachten; in einer der beiden Kleinhirnpräparationen taucht eine zweite, 1.7 kb mRNS Spezies auf. Bedeutsam wird dieses Ergebnis durch den gleichzeitigen Befund einer anderen Arbeitsgruppe, die in der Lage war, zwei mRNS Formen für das L3T4 Molekül, dem murinen Analog des humanen CD4, im Maushirn nachzuweisen (Tourvielle 1986). Der Nachweis der kürzeren Form der mRNS in nur einer der beiden Kleinhirnpräparationen, läßt sich vermutlich durch die diskrete lokale Verteilung CD4 positiver Zellen im Hirn erklären.

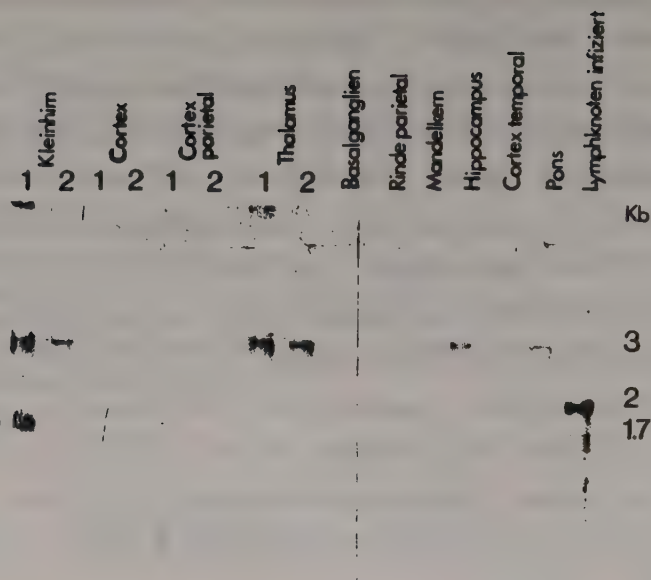


Abb.25: Northernblotanalyse von RNS aus verschiedenen Hirnsubarealen mit CD4 spezifischer cDNS

Ein weiteres interessantes Ergebnis zeigte sich durch Analyse der mRNS, die aus dem Lymphknoten eines AIDS Patienten gewonnen wurde. Hier konnte die 3kb CD4 mRNS nicht mehr nachgewiesen werden; statt dessen zeigte sich eine, um etwa 1kb verkürzte, 2 kb große spezifische mRNS.

Die Ergebnisse bezüglich der Hirnareale wurden gleichzeitig von Dr. I.Funke in der Immunhistologie am Serienschnitt bestätigt (Funke 1987). Sie konnte zeigen, daß im Hirn nicht nur die

Gliazellen CD4 exprimieren, sondern auch in lokal eng definierten Bereichen CD4 exprimierende Neuronenkluster zu finden sind. Besonders augenscheinlich treten diese Neurone in Bereichen des Thalamus zu Tage. Die Bedeutung dieser Befunde wird im nachfolgenden Abschnitt noch ausführlich diskutiert werden.

3. DISKUSSION

3.1 Diskussion der Ergebnisse zum T Zellrezeptor

3.1.1 Diskussion der Methoden

Die cDNS Klonierungsergebnisse der humanen T Zelleukämie MF zeigen, daß polyA⁺ RNS als Ausgangsmaterial zur cDNS Synthese nicht unbedingt benötigt wird, da ein Priming mit oligo dT von Gesamt RNS ebenfalls möglich ist. Dies hat den Vorteil, daß die RNS nicht durch mehr Arbeitsschritte als erforderlich strapaziert wird. Die Qualität der RNS ist jedoch die wichtigste Voraussetzung für die Güte der resultierenden cDNS. Zusätzlich erlaubt diese Methode die Herstellung von cDNS Genbanken klonierter Zellen, die nur in geringer Zellzahl zur Verfügung stehen. Die Insertlängen klonierter cDNS beweisen, daß die einfach isolierte Gesamt RNS ein ebenso gutes Ausgangsmaterial für eine cDNS Synthese darstellt wie polyA⁺ RNS. 25% der TCR spezifischen Klone enthalten eine nahezu komplette cDNS Kopie. Die beschriebene Kombination verschiedener cDNS Syntheseprotokolle hat sich bewährt und erlaubt eine cDNS Synthese- und Klonierung im Zeitraum von nur einer Woche. Optimierbar scheint hingegen noch das Protokoll zur S1 Nuklease Behandlung der cDNS, da den sequenzierten cDNS Klonen einige Nukleotide am 5' Ende fehlen. Dies ist vermutlich auf zu aktiv eingesetzte S1 Nuklease zurückzuführen.

3.1.2 TCR Alpha- und Betakette der Leukämie MF exprimieren bislang unbekannte V Gensegmente

Die Sequenzen der jeweiligen variablen Regionen der Alpha- und Betaketten beschreiben neue Genelemente und erweitern damit das bislang bekannte Repertoire von V Elementen (Abb.10 und 13).

Die unterschiedlich starke Transkription des V α Elements im Thymus verglichen mit der peripherer T Zellen ist ungewöhnlich. Es zeigt sich, daß dieses V Gen im Thymus selten funktionell umgelagert wird, während es in der Peripherie ein Prozent der gesamten, für T Zellrezeptoren kodierenden mRNAs ausmacht (Abb.16, Tab.I).

Verständlich wird der Befund wenn man annimmt, daß dieses V Element für die Antigenerkennung in der Peripherie wichtig ist und deshalb eine besondere Anreicherung durch Selektion erfährt. Die Häufigkeit der Transkriptionen der V Gene im peripheren Blut entspricht den Daten über die Expression der für Jurkat beschriebenen V Gene. Analysen mit einem klonotypischen Antikörper zeigten, daß die V Elemente der Jurkat T Zelllinie 1% der peripher exprimierten V Gene ausmachen. Da diese Zelllinie ebenfalls eine *in vivo* generierte maligne T Zelle ist und eine Expressionsfrequenz von 1% relativ hoch ist, könnte dies eine Begründung für die besonders häufige Entartung solcher T Zellen sein. Es werden also diejenigen T Zellen besonders oft von maligner Entartung betroffen, die häufiger im peripheren Blut anzutreffen sind. Dies würde bedeuten, daß die Transformation solcher T CLL außerhalb des Thymus stattfindet, was im Einklang mit dem reifen Phänotyp dieser Leukämien steht.

3.1.3 Ist die T Zellrezeptor Alphakette ein integrales Membranprotein?

Wie bereits erwähnt, findet sich in der Sequenz für die TCR Alphakette eine potentielle Akzeptorstelle der N-gekoppelten Glykosylierung im Bereich der Transmembranregion. Als Akzeptorstelle fungiert immer die Aminosäuresequenz Asparagin- X- Serin oder Asparagin- X- Threonin, wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann. Die Glykosylierung an dieser Stelle im hydrophoben Bereich der Transmembranregion läuft den Hydrophobizitätsansprüchen, die an solche Regionen gestellt werden, zuwider. Sollte eine Verankerung des Moleküls in der Membran dennoch erfolgen, kommt als Alternative die Bindung über den Kohlenhydratrest an ein Glykolipid in Betracht. Hierfür spricht auch, daß das Thy-1 Molekül der Maus, ebenfalls ein Vertreter der Immunglobulinsupergenfamilie, über seinen Kohlenhydratanteil in der Membran verankert ist (Williams 1982). Unterschiedliche Lokalisationen von Genprodukten entweder als membranintegrierte Proteine oder als sezernierte Moleküle konnten für die Qa Gene der Maus, deren Transmembranregion denen der TCR Alphakette ähnlich ist, gezeigt werden (Stroynowsky 1986). Eine Verankerung der TCR Alphakette nach Art der Assoziation von β -2 Mikroglobulin mit den Klasse I Genprodukten ist ebenfalls denkbar, da Alpha- und Betakette kovalent miteinander verbunden sind.

3.1.4 Modellvorstellungen zur Antigenerkennung durch T Zellen

Ein interessanter Aspekt ergibt sich durch die Tatsache, daß im 5' Bereich der V Region der Betakette und im 5' und 3' Bereich der V Region der Alphakette mehrere Cysteine kodiert werden. Dies gilt auch für die in der Literatur bislang beschriebenen V Genelemente. Cysteinreste sind für die Konformation des Moleküls von besonderer Bedeutung. Daher lohnt es sich über alternative Möglichkeiten der Domänenbildung durch Disulphidbrücken mit unterschiedlichen Cysteinen zu spekulieren. Diese ermöglichen eine begrenzte Diversität durch Generierung unterschiedlicher Konfigurationen, der Proteine, die von ein und demselben V Genelement kodiert werden.

Greift man diesen Gedanken auf, erfährt eine alte Hypothese der Antigenerkennung durch B Zellen, nun auf die Antigenerkennung durch T Zellen angewandt, neue Bedeutung. Zwei verschiedene Vorstellungen über den der Antigenerkennung zugrunde liegenden Mechanismus werden diskutiert: die eine besagt, daß die Antigenbindungsstelle schon die fertige räumliche Struktur zur Erkennung des betreffenden Antigens aufweist, also eine starr mechanistische Interpretation nach dem Schloß/Schlüssel Prinzip. Die zweite Hypothese postuliert, daß im Antikörpermolekül nur der grobe Rahmen für die Antigenerkennung festgelegt ist. Hiernach erfolgt die exakte räumliche Konformation der Bindungsstelle erst im Augenblick des Zusammentreffens von Antigen und Antigenbindungsstelle (Instruktionshypothese)(Breinl 1930). Mit Hilfe dieses Modells läßt sich die Kreuzreaktivität von Antikörpern erklären. Auf den TCR übertragen könnte es verständlich machen, daß die begrenzte Anzahl unterschiedlicher V Regionen in der Lage ist, die Fülle der Antigene zu erkennen. Unterschiedliche Faltungsmöglichkeiten der Alpha- und Betaketten

bieten auch eine Erklärung für die beschriebenen Kreuzreaktivitäten von T Zellklonen, für die bislang die Koexistenz zweier antigenspezifischer T Zellrezeptoren gefordert wurde. Nach den hier gewonnenen Befunden und Modellvorschlägen ist daher das Produkt eines V Gens ausreichend, um für unterschiedliche Proteinkonformationen mit verschiedenen Funktionen zu kodieren.

Da T Zellen Antigen in der Regel nur in prozessierter Form erkennen, wird dadurch die natürlich vorkommende Vielfalt der Antigene durch die antigenpräsentierenden Zellen vermutlich begrenzt. Ein bereits definierter Mechanismus zur Diversität der T Zellantigenrezeptoren liegt in der Variation der D Elemente durch Veränderung von Basenpaaren in dieser Region, die eine N-terminale Variation im Protein zu Folge hat (Leiden 1986). Diesen Prozess würde die hier vorgeschlagene Disulphidbrückenvariation unterstützen, die eine begrenzte Plastizität der Rezeptormoleküle zulässt. Eine variable Disulphidbrückenausbildung ist für Alpha- und Betaketten gleichermaßen möglich.

3.1.5 Die Evolution des TCR Alpha- Locus

Der Vergleich der V Region der pMF Alphakette mit bisher bekannten V Sequenzen zeigt signifikante Homologien nur für Teilsequenzen der V Elemente. Homologien über den gesamten V Genbereich finden sich nur innerhalb einer V Genfamilie (>85%), während Homologien zu anderen Familien selten 60% überschreiten. Hohe Homologien über alle V Familien ergeben sich nur bei Vergleich von V Teilsequenzen von 60-70 bp Länge. Für zwei drittel der pMF 3.2 V Region ergibt sich eine 94%ige Homologie mit dem Klon HAP 36 (Yoshikai 1986). Eine Intra- V Genrekombination jüngerer Ursprungs zwischen zwei V Genen unterschiedlicher Genfamilien könnte diesen Befund erklären.

Dies ist jedoch auszuschließen, da im Southernblot keine Kreuzreaktivität der V α Genprobe mit einer zweiten V Gensequenz gefunden wurde (Abb.15). Bei dem aufgrund dieses Ergebnisses durchgeführten Vergleichs der HAP Sequenzen konnte ebenfalls ein Mosaik in den V Genregionen gezeigt werden. Die Homologiegrade und die Lokalisation der homologen Bereiche sind in Abb.26 schematisch dargestellt. Im Falle von HAP 44 ergab sich eine 74%ige Homologie zum J Bereich des Klon HAP 51. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß V Elemente im Laufe der Evolution durch Kondensation von J-ähnlichen Segmenten entstanden sind. Die so gebildeten Elemente blieben in der Keimbahn erhalten, da sie zu einer Verbesserung in der Antigenerkennung führten. Die genomische Organisation des TCR Alpha-Locus unterstützt diese Hypothese. Dieser Genort zeigt den ursprünglichen Aufbau, den man im Falle eines derartigen Evolutionsprozesses fordern muß. Er besteht aus wenigen V Elementen, einer Vielzahl von J Segmenten und einer konstanten Region. Zusätzliche D Elemente stellen demnach eine weitere spezifische Anpassung von Antigenerkennungsstrukturen dar. Sie sind für den TCR Alpha-Locus bislang nicht nachgewiesen worden. Diese Hypothese zur Entstehung von V Regionen wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Mindestgröße von Bereichen hoher Homologie immer zwischen 60-70 bp liegt, also der Länge von J Elementen entspricht. Eine ähnliche Theorie wird für die Entstehung von Klasse I Genen vertreten. Hier konnte eine 45 bp lange Sequenz als Basiselement für die Evolution dieser Strukturen identifiziert werden (Ohno 1982).

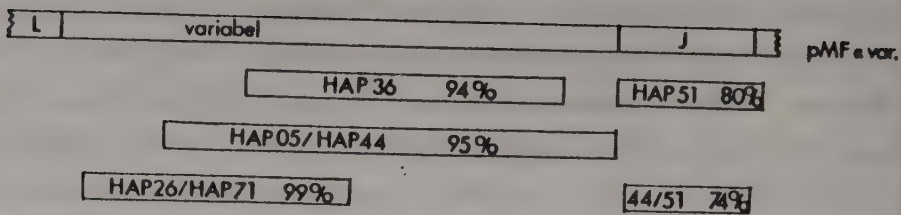


Abb.26: Schematische Darstellung des Homologievergleichs von V Genteilsequenzen

3.1.6 Die T Zelleukämie als Modell eines *in vivo* T Zellklons

Klonierung und Sequenzierung des TCR der Leukämie MF ergaben, daß die von der Nukleinsäuresequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen zur Ausbildung einer normalen Proteinstruktur führen (Abb.10, 13, 14). Translokationen zwischen Chromosom 8/11 und Chromosom 14, dem Träger des Locus für die TCR Alphakette, werden als charakteristisch für T Zelleukämien angesehen (Greaves 1986)). Im Falle der hier untersuchten T CLL ist gezeigt, daß keine Translokation stattgefunden hat, die die Bildung einer funktionellen Alphakette beeinflusst. Ferner ergibt sich ein stabiles Rearrangierungsmuster, daß in Southernblotanalysen über den Beobachtungszeitraum eines Jahres keine Veränderungen zeigte (Abb.15). Es findet weder ein Austausch von konstanten Genelementen der Betakette statt, der mit der Isotypvariation von Immunglobulinen vergleichbar ist, noch werden V Genelemente ausgetauscht. Letztere Möglichkeit wurde zur Erklärung der Funktionsänderung eines *in vitro* T Zellklons diskutiert (H. Wekerle, pers. Mittlg.). Die Southernblotbefunde zeigen keinen Hinweis auf somatische Rearrangierungsprozesse, wie sie *in vitro*

für den TCR Alpha- Locus unter Einfluß von rekombinantem Interferon angeblich schon nach kurzer Zeit auftraten (Chen 1986a) (Chen 1986b). Dies legt die Vermutung nahe, daß diese Beobachtungen ein *in vitro* Phänomen beschreiben. Auch erstaunt es, daß diese Publikation Umlagerungen im TCR Alpha- Locus des zweiten Chromosoms nachweisen will. Rearrangierung im TCR Alpha- Locus läßt sich nur mit einer V Probe erfassen, die im rearrangierten Element liegt. Grund hierfür sind die großen genomischen Entfernungen zwischen V α Segmenten und dem konstanten Genelement. An der hier beschriebenen T Zelleukämie kann nun untersucht werden, ob es zu somatischen Mutationen in T Zellantigenrezeptoren kommt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß sich der Funktionsverlust leukämischer T Zellen des Patienten M.F. nicht auf Störungen des T Zellrezeptorkomplexes auf Genebene zurückführen lässt. Damit können auch primäre Veränderungen in den entsprechenden Proteinen ausgeschlossen werden. Ob jedoch untypische Phosphatierungen an Tyrosinresten des TCR als funktionsstörende Prozesse in Betracht kommen, ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden (Samelson 1986). Die zur malignen Transformation führenden Ereignisse dürften letztendlich sehr vielschichtig sein und können auch Prozesse involvieren die der Antigenerkennung nachgeordnet sind. Klinisch bedeutsam ist jedoch die Tatsache, daß die Umlagerung der T Zellrezeptorgene den Nachweis eines klonalen Ursprungs ermöglicht und damit zu einer eindeutigen Klassifizierung von Leukämien beiträgt. Im Falle der T Zelleukämien bedeutet dies, daß der TCR eine tumorspezifische Struktur darstellt. Von daher ist der Versuch Antikörper gegen rekombinate TCR Proteine von Leukämien zu generieren ein sinnvoller Ansatz zu einer neuen Therapiemöglichkeit dieser Erkrankung. Der klinisch oft langfristig stabile Zustand von Patienten mit chronischer Leukämie

sichert die nötige Zeitspanne zur Durchführung solcher Arbeiten. Problematisch bleibt zur Zeit noch das Verfahren der Antikörperherstellung gegen Fusionsproteine. Neue Generationen von Expressionsvektoren sollten hier Abhilfe schaffen.

3.2 Diskussion der Ergebnisse zum CD4 Antigen

Schon relativ früh wurden Oberflächenantigene als charakteristisch für funktionelle Untergruppen immunkompetenter Zellen erkannt. Als Marker für die Gruppe der Helfer/Induktor T Zellen wurde das CD4 Molekül definiert. Da *in vitro* generierte CD4 positive T Zellen immer Klasse II Antigene als Restriktionselemente benutzen, wurde postuliert, daß das CD4 Molekül den Antigenerkennungsprozess durch den T Zellantigenrezeptor über die Affinität zu einer monomorphen Determinante auf solchen Molekülen verstärkt. Von aktueller Bedeutung ist außerdem, daß CD4 essentieller Bestandteil des HIV Rezeptorkomplexes ist. Das durch HIV induzierte Krankheitsbild ist durch eine Symptomenvielfalt gekennzeichnet, von denen hier nur einige genannt sein sollen (Neidt 1985): Absinken der CD4 positiven zirkulierenden T Zellen und Monozyten (Gottlieb 1981) (Rieber 1986) (Glycerkey 1985), polyklonale B Zellstimulation (Katz in press) und Verlust des B Zellgedächtnisses für sogenannte "recall-Antigene", hohe Viruskonzentration im Liquor cerebrospinalis, neurologische Defekte wie Konzentrations-, Gedächtnis- und Bewegungsstörungen bis hin zu spastischen Lähmungen (Metroka 1983).

Das Absinken CD4 exprimierender zirkulierender T Zellen und Monozyten ist über eine direkte zytopathische Wirkung des Virus auf diese Zellen oder das Abtöten durch Synzytiumformation mit bereits infizierten Zellen erklärbar. Für die übrigen in den

Krankheitsprozess einbezogenen Zellen ist jedoch ein anderer Mechanismus zu fordern.

3.2.1 CD4 Antigenexpression auf B Zellen

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen eindeutig, daß B Zellen in der Lage sind CD4 in begrenztem Ausmaß und vermutlich differenzierungsabhängig zu exprimieren (Abb.19-23). Damit sind auch sie einer direkten Infektion durch das Virus zugänglich. Es mag an der verminderten CD4 Rezeptordichte auf B Zellen oder in einer veränderten Wirtslage begründet sein, daß B Zellen durch HIV nicht abgetötet werden, obwohl das Virus unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage ist auch hier zu replizieren. Die erste Zelllinie, in der das Züchten dieses Virus *in vitro*, gelang war eine B Zelllinie (Barre-Sinoussi 1983)(Montagnier 1984). B Zellen stellen somit ein Virusreservoir im lymphatischen System dar. Die Beeinträchtigung der B Zellen durch Virus reicht jedoch aus, B Zellen bestimmter Entwicklungs- oder Differenzierungsstufen und die immunologische "Gedächtnisfunktion" zu stören, wobei sich dies in einer verminderten "recall" Reaktion auf bestimmte Antigene und in polyklonaler Stimulation der Antikörperproduktion manifestiert. Die Störung auf B Zellniveau läßt sich zum einen auf direkte zytopathische Viruseffekte zurückführen, zum anderen kann sie auch durch beeinträchtigte T Helferfunktion bedingt sein.

3.2.2 CD4 Expression auf Zellen nichtlymphoiden Ursprungs

Die Resultate im Northernblot an RNS Präparationen von Gliazelllinien und Gehirnsubarealen weisen das Vorhandensein CD4 spezifischer mRNS im zentralen Nervensystem nach. Transkription konnte für Thalamus, Kleinhirn, Pons und Hippocampus gezeigt werden (Abb.25). Außerdem synthetisieren zwei von fünf untersuchten Gliazelllinien CD4 spezifische mRNS. Hierdurch ist bereits eine Zellpopulation neuroektodermalen Ursprungs als CD4 exprimierend definiert.

Gemeinsame Untersuchungen mit Fr. Dr. I. Funke zeigen ein distinktes Verteilungsmuster CD4 positiver Neurone in Thalamus, Kleinhirn und Pons (Funke 1987). Besonders auffallend ist die Lokalisation CD4 positiver Neurone in der Nähe des Plexus choroideus, dem Bildungsort des Liquor cerebrospinalis. Diese räumlich enge Nachbarschaft wird besonders unter dem Aspekt des hohen Virusgehalts des Liquors interessant.

CD4 Antigen positive Zellen im zentralen Nervensystem stellen ein weiteres Virusreservoir dar. Die CD4 exprimierenden Gliazellen und die noch näher zu charakterisierende Subpopulation von Neuronen sind langsam bzw. nicht proliferierende Zellen und als Virusreservoir besonders gut geeignet, da das zentrale Nervensystem durch die Blut/Hirnschranke einer unmittelbaren Kontrolle durch periphere Immunreaktionen entzogen ist. Durch die Möglichkeit eines direkten Befalls CD4 positiver Zellen im Gehirn, wie dies für Astrozyten bereits gezeigt wurde, wird es überflüssig eine indirekte Infektion durch Einwanderung infizierter Monozyten und T Zellen zu postulieren (Epstein 1983)(Gartner 1986). Dieser Mechanismus gewinnt erst nach Infektion der Astrozyten an Bedeutung, da sie für die Aufrechterhaltung der Blut/Hirn Schranke mitverantwortlich sind (Janzer 1987). Eine massive Einwanderung

infizierter Monozyten und T Zellen initiiert Zelltod im Gehirn durch Synzytiumformation, wie dies *in vitro* Versuche bereits gezeigt haben (Sodroski 1986) (Lifson 1986). Einer direkten Infektion von Nervengewebe durch HIV trägt auch die Tatsache Rechnung, daß dieses Virus der Gruppe der Lentiviren zugeordnet wird, zu deren charakteristischen Eigenschaften eine ausgeprägte Affinität zum zentralen Nervensystem gehört (Robertson 1985)(Haseltine 1986).

3.2.2 Das CD4 Molekül als multifunktionales Protein

Betrachtet man das Expressionsspektrum des CD4 Antigens (T Zellen, Monozyten, B Zellen, Gliazellen und Neurone), stellt sich die Frage nach einer verbindenden Funktion für dieses Oberflächenmolekül. Die Funktion des CD4 Moleküls auf funktionellen T Zellen ist die Bindung an eine monomorphe Determinante der Klasse II Restriktionselemente. Im Sinne dieser Hypothese kann CD4 die Rolle eines Zelladhäsionsproteins für Klasse II exprimierende Zellen übernehmen. Diese Hypothese allein kann die Expression des CD4 Moleküls im Zentralnervensystem jedoch nicht erklären.

Ein interessanter Aspekt ergibt sich durch die vor kurzem erfolgte Beschreibung eines neurotrophen Faktors, des Neuroleukins (Gurney 1986a). Dieser von T Zellen produzierte Faktor wirkt in einer Monozyten- abhängigen Weise auf die Differenzierung von B Zellen und sichert das Wachstum und Überleben sensorischer Neurone *in vitro* (Gurney 1986b). Neuroleukin beeinflusst also alle Zelltypen, die in dieser Arbeit als CD4 exprimierende Zellen beschrieben werden. Es kann folglich diskutiert werden, daß CD4 der zelluläre Rezeptor für Neuroleukin ist. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Existenz eines Bereichs hoher Homologie zwischen

Neuroleukin und einer konservierten Region des HIV Hüllproteins, die für die Bindung von Virus an CD4 verantwortlich sein könnte. Die als äquivalent beschriebenen Verteilungsmuster von CD4 im Affenhirn und von Rezeptoren für Neuropeptide unterstützen diese Hypothese zusätzlich (Pert 1986). Eine Kompetition von HIV und Neuroleukin um ihren zellulären Rezeptor gekoppelt mit einer "down" Regulation der Oberflächenexpression von CD4 nach HIV Infektion könnte die Ursache für die pathologischen Wirkungen von HIV auf B Zellen und Zellen des zentralen Nervensystems sein.

3.2.3 Alternatives Spleißen von CD4 spezifischer mRNS

Die Analyse von RNS Präparationen aus Hirnsubarealen erbrachte den Beweis, daß ein Mechanismus für alternatives Spleißen der mRNS für das CD4 Protein möglich ist. In einer der beiden Kleinhirnpräparationen ließen sich zwei mRNS Formen nachweisen (Abb.25). Ob die kürzere CD4 mRNS für ein intaktes CD4 Molekül kodiert ist nicht bekannt. Des weiteren ist nicht klar ob, diese mRNS nur von einem definierten Zelltyp transkribiert wird oder zusätzlich zur 3 kb mRNS vorkommt. Zur Klärung dieser Frage kann auch nicht die über Southernblotanalyse geschätzte genomische Größe des CD4 Locus beitragen, da er mit etwa 20 kb Länge auch für mehrere homologe Gene kodieren könnte (Maddon 1985).

Durch HIV induzierte pathologische Vorgänge können ebenfalls eine geänderte Transkription CD4 spezifischer mRNS bewirken. Die Untersuchung der aus dem Lymphknoten eines AIDS Patienten isolierten RNS zeigt nicht die 3kb CD4 spezifische mRNS, sondern eine verkürzte 2kb mRNS (Abb.25). Ein Zusammenhang zwischen der verminderten Oberflächenexpression von CD4 nach Infektion einer Zelle mit HIV und dem Verschwinden der 3kb CD4 spezifischen mRNS wurde jüngst beschrieben (Hoxie 1986). Die besonderen

Proteinfaktoren, die das Virus zur Verstärkung der eigenen Transkription bildet, bieten eine Erklärungsmöglichkeit für die Synthese der verkürzten 2kb CD4 spezifischen RNS. Das HIV Genom kodiert u.a. für als *tat*- und *art/trs* bezeichnete Genprodukte. Das *tat* Protein ist ein trans- aktivierender Faktor der Virustranskription, das *art/trs* Produkt scheint unterschiedliche Leseraster der Virussequenz über die Induktion alternativer Spleißvorgänge zu ermöglichen (Chen I. 1986). Das hier vorgestellte Resultat an RNS aus infiziertem Zellmaterial legt den Schluß nahe, daß dieses *art/trs* Produkt auch auf zelluläre mRNS Synthesen einen Einfluß hat und dadurch zu Dysregulationen in den infizierten Zellen führt. Diese Interpretation wird gestützt durch den Befund, daß die Transkription des Fc γ Rezeptorgens unter HIV Einfluß eine Änderung zu Gunsten einer größeren mRNS Spezies erfährt (Kikutani 1986). Es scheint sich hierbei um ein allgemeines Phänomen zu handeln, das HIV in seinen Zielzellen induziert. Eine Klärung dieser virusinduzierten Vorgänge in Zellen und Geweben wird einen Einblick in zelluläre und virale Regulationsprozesse ermöglichen.

Von Interesse sind gleichfalls weiterführende Experimente zur Überprüfung der Hypothese, daß CD4 ein Interaktions- und Rezeptormolekül von großer neuroimmunologischer Relevanz ist.

Abkürzungen

AIDS	acquired immunodeficiency syndrom
Amp	Ampizillin
ATP	Adenosin -5'-Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BFB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	komplementäre DNS
cpm	Impulse pro Minute
CTP	Cytidin -5'-Triphosphat
dATP	Desoxy -ATP
dCTP	Desoxy -CTP
dGTP	Desoxy -GTP
dTTP	Desoxy -TTP
DNase	Desoxyribonuklease
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Diamintetraazetat
FACS	Fluoreszenzaktivierter "Cell sorter"
FCS	fötales Kälberserum
GTP	Guanosin -5'-Triphosphat
HEPES	2,4(2Hydroxyäthyl)piperaziny- äthansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IPGT	Isopropyl- α -D-thiogalactopyranoside
kb	Kilobasen
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NTP	A, C, G oder T
PBS	Phosphat-Salinepuffer
PVP	Polyvinylpyrrolidon

RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDB	Natriumlaurylsulfat
ss	Einzelstrang
SSC	Standard-Saline-Zitrat -Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA -Puffer
TE	Tris-EDTA -Puffer
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymidin -5'-Triphosphat

4.MATERIAL und METHODEN

4.1.Material

4.1.1.Zelllinien

Jurkat	T-Zelllinie (CD3 ⁺ ,CD4 ⁺ ,CD8 ⁻ ,CD2 ⁺)
U937	Monozytenlinie (CD4 ⁺)
THP 1	Monozytenlinie
MonoMuc	Monozytenlinie
N18	Neuronenzelllinie, Ratte
N59	Gliazelllinie
N63	Gliazelllinie
N64	Gliazelllinie
N66	Gliazelllinie
Berry	Gliazelllinie
Fogharty	Gliazelllinie
H55	Hybridom
5E9	Hybridom
Olga	EBV transformierte B- Zelllinie
KT II	"
EMJ	"
E.S.	"
LM	"
MuWa	"
MuWi	"
ChrWi	"

CorLu	"
CoJ	"
SCH	"
BAK	"
R.L.	EBV transformierte B-Zelllinie

4.1.2. Monoklonale Antikörper und Antiseren

MT 151	anti CD4 Monoklonale, Geschenk von
MT 310	Prof. Dr. Rieber,
MT 321	Immunologie, München
Leu 3a	anti CD4 Monoklonal, von
	Fr. Dr. Schendel zur Verfügung
	gestellt, Immunologie, München
FITC Kaninchen	
anti Maus Serum	Dakopatts
FITC Ziege	
anti Kaninchen	
Serum	Dakopatts

4.1.3. Chemikalien

Agarose Typ II medium EEO	Sigma, München
Agarose Typ VII, low gelling temp.	Sigma, München
Ampizillin	Sigma, München
Bacto Agar	Difco, Detroit
Blue-Gal	BRL, Gibco, Karlsruhe
BSA	Sigma, München
Caesiumchlorid	BRL, Gibco, Karlsruhe
Dextransulfat (Na -Salz)	Serva, Heidelberg

DNS (aus Lachasperma)	Sigma, München
DTT	Sigma, München
dATP	Pharmacia, Freiburg
dCTP	Pharmacia, Freiburg
dGTP	Pharmacia, Freiburg
dTTP	Pharmacia, Freiburg
Ethidiumbromid	Sigma, München
EluTip-d Säulen	Schleicher & Schüll, Dassel
Ficoll 400	Sigma, München
Harnstoff p.a.	BRL, Gibco, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Detroit
High-Bond N Membran	Amersham, Braunschweig
IPTG	Sigma, München
Kaliumazetat	Fluka, Buchs Schweiz
Molekulargewichtsstandard (1kb)	BRL, Gibco, Karlsruhe
Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Nonidet P 40	Sigma, München
SDS	Sigma, München
Sephadex G 50	Pharmacia, Freiburg
Spermidin	Sigma, München
Trypton	Difco, Detroit
Whatman 3MM Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

Die verwendeten Chemikalien, die hier nicht aufgeführt sind wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

4.1.4. Radiochemikalien

^{32}P α -dATP (3000 Ci /mM)	Amersham, Braunschweig
^{32}P α -dCTP (3000 Ci /mM)	Amersham, Braunschweig
^{32}P γ -dATP (5000 Ci /mM)	Amersham, Braunschweig

4.1.5. Enzyme

Alkalische Phosphatase (intestine)	Boehringer
Bam HI	Boehringer
DNS -Polymerase I (Kornberg Polymerase)	Boehringer
DNS -Polymerase I (Klenow Fragment)	Boehringer
DNase	Boehringer
Eco RI	Boehringer
Hae III	Boehringer
Hha I	Boehringer
Hind III	Boehringer
Proteinase K	Boehringer
Pst I	Boehringer
Pvu II	Boehringer
AMV Reverse Transkriptase	Beard, Life Science
RNase A	Genofit
RNase T	Boehringer
Rsa I	Boehringer
Sac I	Boehringer
Sal I	Boehringer

T4 -DNS -Ligase

Boehringer

T4 Terminale Transferase

PL, Pharmacia

T4 Polynukleotid Kinase

Boehringer

Eine Einheit eines Enzyms bezeichnet die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 µg Substrat in einer Stunde umzusetzen.

4.1.6.Vektoren

pUC 8

pUC 9 und pUC 9 dG-tailed

Pharmacia

M13 mp 10 und 11

Pharmacia

pEX 1,2 und 3

Geschenk von Dr. Stanley

EMBL, Heidelberg

4.1.7.Bakterienstämme

JM101 (E.coli) supE, thi, delta(lac⁻proAB), (F', traD36, proAB, lacIqZ delta M15)

DK 1 (E.coli) F⁻, recA⁻, endA⁻, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA⁻, lambda⁻

MC 1061 (E.coli) araD139, delta(ara, leu)7697, delta lacX74, galU⁻, galK⁻, hsr⁻, hem⁺, strA (19)

HB 101 (E.coli) F⁻, hsdS20 (r⁻Bm⁻B), sup E44, ara14, galK2, lacY1, proA2, mt11, recA13, lambda⁻

POP (E.coli)F⁻, recA⁻, kodiert einen temperatursensitiven
Repressor der λ Galaktosidase

4.1.8. Fotomaterialien

Röntgenfilme :	X -Ray 90	Linhart
Verstärkerfolien :	MR 400	Linhart
Polaroidfilme :	Typ 667	Polaroid

4.1.9. Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

% Feststoffeinwaagen beziehen sich immer auf w/v,

% Flüssigkeit auf v/v

Für alle Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet

4.1.9.1. Bakterienkulturmedien (E. coli)

LB -Medium :

1	%	Trypton
0.5	%	Hefeextrakt
1	%	NaCl

LB -Agar :

1	%	Trypton
0.5	%	Hefeextrakt
1	%	NaCl
1.2	%	Bacto Agar

TYM -Medium :

- 2 % Trypton
- 0.5 % Hefeextrakt
- 0.5 % NaCl
- 10 mM MgCl₂
- (20 mM Glukose)

Minimalmedium:

- 34 mM Dinatriumhydrogenphosphat
- 22 mM Kaliumhydrogenphosphat
- 18 mM Ammoniumchlorid
- 9 mM Natriumchlorid
- 1 mM Magnesiumsulfat
- 0.1 mM Kalziumchlorid
- 1 mM Thiaminhydrochlorid
- 0.2 % Glukose

Minimalplatten:

Minimalmedium plus 1.5% Bacto Agar

H-Medium:

- 1% Bacto Tryptone
- 0.8% Natriumchlorid

H-Platten:

H-Medium plus 1% Bacto Agar

H-Top Agar:

H-Medium plus 0.8 % Bacto Agar

Für die Selektion auf Antibiotika wurde den Medien bzw Platten

folgende Endkonzentrationen an Antibiotika beigelegt :

Ampizillin : 50 μg /ml

Tetrazyklin-Hydrochlorid : 12.5 μg /ml

Freezing-Medium für E. coli (2fach konz.):

50 mM K_2HPO_4

25 mM KH_2PO_4

3 mM Na-zitrat

0.6mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

90 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

8.8 % Glycerin

4.1.9.2.Allgemeine Puffer

PBS -Puffer (Phosphat-Salinepuffer)

150 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

1.5 mM KH_2PO_4

SSC -Puffer (Standart-Saline-Zitratpuffer)

15 mM Tris /HCl pH 7.5

150 mM NaCl

15 mM Na- zitrat

TE -Puffer (pH 7.5 oder pH 8.0) :

10 mM Tris /HCl pH 7.5, 8.0

2 mM EDTA

TBE Puffer:

90 mM Tris-HCl pH 8.0

90 mM Borsäure

2 mM EDTA

Loening Puffer:

36 mM Tris-HCl pH 8.0

80 mM Natriumdihydrogenphosphat-2-Hydrat

1 mM EDTA

Denhardt's Reagenz (100x) :

2 % BSA (Rinderserumalbumin)

2 % Ficoll 400

2 % PVP (Polyvinylpyrrolidon)

Phenol (pH 8.0) :

Destilliert

Ausschütteln mit 0.1 M Tris /HCl pH 10 bis

Phenol pH 8.0 aufweist.

4.2.METHODEN

4.2.1.PROTEINARBEITEN

4.2.1.1.Herstellung einer Immunmatrix zur

Immunpräzipitation

Das Arbeiten mit monoklonalen Antikörpern in der Biochemie ist oft entscheidend beeinflusst von der Qualität der zur Verfügung stehenden Antikörper und der Kopplungsfähigkeit derselben an eine Trägerstruktur. Zu diesem Zweck wurde der gegen das CD4 Glykoprotein gerichtete monoklonale Antikörper MT151, der, laut

empirischer Befunde die grösste Affinität von allen uns verfügbaren Antikörpern gegen diese Struktur besitzt, an eine Sepharose/Protein A Matrix kovalent gekoppelt. Protein A (ein bakterielles Oberflächenprotein) hat die Fähigkeit, konstante Teile bestimmter Immunglobulin Subtypen zu binden. Im vorliegenden Fall ist das der Fc Teil der IgG- 2A Moleküle des MT 151 monoklonalen Antikörpers. Als Basisprotokoll hierzu diente eine von Schneider et al. beschriebene Methode (Schneider 1982), die in nachfolgend beschriebener Weise leicht modifiziert wurde: statt der empfohlenen einmaligen Inkubation der zu koppelnden Matrix im Kopplungspuffer (50 mM Dimethylpimelimidat in 0.2 M Triäthanolamin pH 8.2) wurde dieser Vorgang viermalig jeweils 15 Minuten mit immer frisch angesetzttem Kopplungspuffer durchgeführt. Dies hat zu Folge, daß eine stabilere Kopplung des Immunglobulins an den Träger erreicht werden kann und beim Ablösen von immunpräzipitiertem Material weniger gekoppelte Antikörperpolymere mit eluiert werden.

4.2.1.2. Immunpräzipitation und Gelelektrophorese

Zur Immunpräzipitation von CD4 Glykoprotein wurden die Zelllinien Jurkat oder U937 als konstitutiv exprimierende Linien verwendet, die B-Zelllinien wie beschrieben (s. Liste der verwendeten Zellen und Ergebnissteil). Das abzentrifugierte Zellkulturmaterial (10^6 Zellen im Falle von U937 und Jurkat, $1-5 \text{ mal } 10^6$ für die B-Zelllinien) wurde zunächst zweimal in PBS gewaschen und anschließend in NP-40 haltigem Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.3, 1 mM Magnesiumchlorid, 1% v/v NP40, 0.1 mM Proteaseinhibitoren) resuspendiert und eine Stunde auf Eis lysiert. Als Proteaseinhibitoren dienten dabei PMSF und Benzamidin. Nach erfolgter Zellyse werden die unlöslichen Bestandteile wie

Zytoskelettkomponenten und Zellkerne durch einmalige Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000g entfernt. Der klare, wässrige Überstand kann dann sofort zur weiteren Inkubation mit der möglichst frisch hergestellten Immunmatrix auf einer Rollervorrichtung inkubiert werden. Die spezifische Immunpräzipitation wird eine Stunde bei 4°C durchgeführt. Anschließend wird das nunmehr an die Immunmatrix gebundene CD4 Protein durch eine einmalige, fünf Minuten dauernde Zentrifugation bei 600g sedimentiert. Das Pellet wird daraufhin dreimal mit PBS gewaschen und abschließend mit 50 µl denaturierendem Proteinprobenpuffer (50 mM Diethylamin pH 11.2, 0.5% Desoxycholat) versetzt, um das nicht kovalent gebundene, immunpräzipitierte Protein wieder von der Trägermatrix abzulösen. Der nach nochmaliger Zentrifugation gewonnene, proteinhaltige Überstand wird mit 0.5 molarem Natriumphosphat neutralisiert und kann dann sofort zur elektrophoretischen Auftrennung verwendet werden. Dies geschieht in einem Polyacrylamidgelsystem mit 7.5% Acrylamidgehalt bei konstanten 40 Volt Spannung über Nacht (O'Farrell 1975).

Um die Lauffront erkennbar zu machen, kann den Proben noch etwas Bromphenolblau zugesetzt werden. Im Anschluß an die Elektrophorese der Proben wird das Gel ohne weitere Sonderbehandlung zum Blotten verwendet.

4.2.1.3. Westernblot

Eine Vorinkubation des Gels für 30 Minuten in Blottingpuffer, der mit 30% Methanol versetzt ist, kann die Effizienz des Proteintransfers im Blottingvorgang erheblich steigern (Neefjes 1986). Das Blotting selbst kann dann ohne methanolhaltigen Puffer vorgenommen werden. Der Blotaufbau entspricht dem eines Southernblots. Die Proteine sind negativ geladen und wandern daher während des Blotvorgangs zur Anode. Das Gel wird auf eine mit Blotpuffer getränkte Schaumstoffmatte gelegt, darauf kommt die Nitrozellulose, die noch mit einem getränkten Whatman 3MM Papier abgedeckt wird. Zuerst wird dann nochmals eine puffergetränkte Schaumstoffmatte gelegt.

Als Elektroden dienen zwei Kohleplatten, die mit Stromanschlußmöglichkeiten versehen sind. Der Transfer auf die Nitrozellulose findet bei 30-60V Spannung und einem Stromfluß von ungefähr einem Ampere für die Dauer von einer bis 1,5 Stunden statt.

Im Anschluß werden die Probenauftragsstellen auf der Nitrozellulose gekennzeichnet, die Nitrozellulose abgenommen und eine halbe Stunde im Blockpuffer (PBS pH 7.2, 0.05 % Tween, 0.1 % Gelatine) inkubiert. Dies geschieht, um eventuell später auftretende unspezifische Antikörperreaktionen auf der Nitrozellulose zu blockieren und abzusättigen. Daraufgehend wird die Nitrozellulose im spezifischen Antikörper für eine Stunde weiter inkubiert. Die Antikörperlösung kann sowohl antikörperhaltiges Zellkulturmedium als auch eine entsprechende Verdünnung von gereinigtem Antikörper in PBS/10% FCS sein. Es stellte sich als unerheblich heraus, welcher der zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörper zu diesem Zeitpunkt eingesetzt

wurde, da alle spezifischen Reagenzien ein gleichermaßen gutes Blotergebnis lieferten.

Nach Inkubation der geblotteten Nitrozellulose mit anti CD4 Antikörpern wird sie dreimal in PBS/0.05% Tween für fünf Minuten gewaschen, um anschließend in einer weiteren Antikörperlösung eine Stunde lang inkubiert zu werden. Diese zweite Antikörperlösung besteht aus einer 1:200 Verdünnung einer peroxidasegekoppelten Kaninchen anti Maus IgG Präparation. Die enzymgekoppelten Antikörper binden an die, an CD4 Protein gebundene monoklonale Antikörper des ersten Inkubationsschrittes. Nach weiterem dreimaligem Waschen in PBS/Tween wird die enzymatische Reaktion zum Sichtbarmachen der antigenspezifischen Banden vorgenommen. Als Substrat hierzu dienen 100 mg Nitroprussid in 10 ml Wasser, 40 mg o- Dianisidin in 40 ml Wasser und 10 μ l 30%iges Wasserstoffsuperoxyd. Diese Lösungen sollten erst kurz vor Gebrauch angesetzt und gemischt werden. Die enzymatische Entwicklungsreaktion lässt man solange ablaufen, bis die Banden gut sichtbar sind, spült dann mit Wasser und trocknet an der Luft. Ein späteres leichtes Ausbleichen der grünen Farbreaktion ist normal und kann u.U. durch Anfeuchten des Blots mit Wasser teilweise rückgängig machen.

4.2.1.4. Produktion gentechnologisch hergestellter

Fusionsproteine

Kloniert man cDNS im richtigen Leseraster in pEX Vektoren und transformiert diese in E. coli Bakterien des POP Stammes, ein Stamm mit temperatursensitivem Lac- Repressor, kann man die jeweilige cDNS in Protein umsetzen lassen (Stanley 1985). Das Bakterium stellt dieses Protein als Fusionsprodukt mit β -Galaktosidase her und lagert es als unlösliches Produkt im

Zellinnern ab. Aus dem Bakterium kann es dann durch Lyse derselben freigesetzt werden. Zur Proteinherstellung impft man eine, mit pEX Vektor transformierte Bakterienkultur in 100 ml TYM Medium an und läßt bei 30°C über Nacht hochwachsen. Dann wird 1:2 mit auf 42°C vorgewärmtem Medium verdünnt und für vier Stunden bei 42°C inkubiert. Dieser Temperaturwechsel inaktiviert den temperatursensitiven Lac- Repressor und erlaubt die Produktion des Fusionsproteins. Anschließend werden die Bakterien abzentrifugiert und in Lysepuffer aufgeschlossen (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 300 µg Lysozym/ml, 0.5% NP 40). Die Lyse geschieht 15 Minuten bei 65°C, anschließend überführt man auf Eis und inkubiert mit DNase bis das Lysat dünnflüssig wird. Jetzt wird bei 4000rpm 15 Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5% SDS gelöst und gegen Wasser oder PBS dialysiert. Den so gewonnenen Proteinextrakt kann man lyophilisieren und zum späteren Gebrauch in Wasser oder PBS wieder aufnehmen. So hergestellte Fusionsproteine lassen sich zum Immunisieren verwenden.

4.2.2.ZELLULÄRE ARBEITEN

4.2.2.1.Separation von Lymphozyten aus Blut

Im Falle der chronischen T- Zelleukämie, aus der die RNS zur Etablierung der cDNS Genbank isoliert wurde, mussten die T Zellen zunächst aus Vollblut gewonnen werden. Hierzu wurde das 1:1 mit PBS verdünnte Blut in 50 ml Konusröhrchen auf 15 ml Ficolllösung geschichtet. Anschließend wird 20 Minuten bei 600g ohne Bremsung bei Beendigung des Laufes zentrifugiert. Die Lymphozyten befinden sich nun an der Trennfläche zwischen Ficoll und wässriger Blutlösung angereichert und sind als trüber Ring zu erkennen. Die Zellen dieser Interphase werden nun vorsichtig mit einer Pipette

abgenommen und anschließend dreimal mit Kulturmedium (RPMI 1640/10% FCS) gewaschen. Die Zellen können nun einige Tage in Kultur gehalten werden oder sofort zur Anreicherung der T-Zellen über eine Säule aus Nylonwolle weiter verwendet werden (Greaves 1976).

Dazu wird 5g trockene Nylonwolle (ausreichend für 5×10^6 Zellen) in eine 50 ml Spritze gegeben, in Alufolie verpackt und feucht autoklaviert. Danach wird die Säule mit einem dreifachen Säulenvolumen Kulturmedium gewaschen, anschließend bei 37°C im Brutschrank für 45 Minuten inkubiert und noch einmal mit auf 37°C angewärmtem Medium gewaschen. Jetzt können die Zellen aufgetragen werden, die eine Dichte von 5×10^7 Zellen pro ml nicht übersteigen sollten. Danach gibt man nochmals 2 ml Medium zu und inkubiert die beladene Säule 50 Minuten im Brutschrank bei 37°C . Die nicht adhärierenden T Zellen werden mit einer Fließrate von 2-3 Tropfen pro Sekunde eluiert. Diese T Zell angereicherte Zellpopulation enthält noch zu ungefähr 5% Ig-positive Zellen, die durch einen weiteren Säulenlauf ebenfalls abgetrennt werden. So gewonnene T Zellen wurden über Nacht in IL-2 haltigem Medium im Brutschrank inkubiert und dann zur RNS Präparation verwendet.

4.2.2.2. Zelluläre Immunfluoreszenz

Der Nachweis von Zelloberflächenproteinen mittels monoklonaler Antikörper lässt sich mit hoher Empfindlichkeit mittels Immunfluoreszenz durchführen. Hierzu werden die zu analysierenden Zellen dreimal in PBS gewaschen und anschließend auf Eis mit dem jeweiligen monoklonalen Antikörper in PBS/10%FCS für 30 Minuten inkubiert. Daran schließen sich drei weitere Waschvorgänge mit PBS an und eine weitere halbstündige Inkubation mit FITC gekoppeltem Kaninchen anti Maus Ig Serum an. Nach mehrfachem Waschen der

Zellen kann die Auswertung der Fluoreszenz entweder im Fluoreszenzmikroskop oder dem fluoreszenzaktivierten Zell - Sorter (FACS) vorgenommen werden. Es ist wichtig alle Inkubations- und Waschvorgänge auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen vorzunehmen, um ein sogenanntes "shedding und capping" der darzustellenden Oberflächenstruktur zu verhindern. Da dies ein energieabhängiger Vorgang ist, genügt das Inkubieren auf Eis, um diesen Vorgang enorm zu verlangsamen.

4.2.2.3. Zytospinpräparation und ELISA

Zur Darstellung definierter Oberflächenstrukturen mittels monoklonaler Antikörper auf Einzelzellen ist die Zytospinpräparationmethode besonders geeignet. Hierzu werden Gewebekulturzellen in PBS zu einer Dichte von 5×10^6 pro ml suspendiert und 200 μ l dieser Lösung mit Hilfe eines Shandon & Southern Zytospingerätes 10 Minuten lang auf Stufe 60 auf entfettete Objektträger zentrifugiert. Die Objektträger werden anschließend an der Luft getrocknet und mit den entsprechenden Antikörpern oder Seren inkubiert. Der Inkubationsmodus entspricht dem für die Anfärbung von Westernblots beschriebenen Protokoll. Als Substrat für die Peroxidase dient in diesem Falle 25 mg Phenylendiamin in 25 ml Zitratpuffer (1 M Zitronensäure, 1 M Natriumzitat, pH 5.0) plus 5 μ l H_2O_2 .

Die Auswertung der rotbraunen Oberflächenfärbung wird nach Eindeckeln der Präparate mit einigen Tropfen Kaiser's Glyzeringelatine unter dem Mikroskop vorgenommen (Scopsi 1985).

4.2.2.4. Rosettierung von T-Zellen und Stimulation von B-Zellpräparationen

Zur Präparation reiner B-Zellpopulationen aus peripheren Blutlymphozyten kann die Eigenschaft der T-Zellen genutzt werden, an Schafer erythrozyten zu binden. Hierzu werden Lymphozyten und Schafer erythrozyten jeweils dreimal in PBS gewaschen und im Verhältnis 1:20 gemischt. Anschließendes Anzentrifugieren bei 600g für fünf Minuten intensiviert den Kontakt zwischen Erythrozyten und Lymphozyten. Die Rosettierung wird eine Stunde auf Eis durchgeführt. Nach vorsichtigem Resuspendieren der rosettierten Zellen wird eine Ficollaufreinigung der Zellen vorgenommen. Die T-Zellrosetten sedimentieren dabei aufgrund höherer physikalischer Dichte, während die B-Zellen in der Interphase verbleiben. Eine zwei- bis dreimal wiederholte Rosettierung resultiert in einer nahezu 100% reinen B-Zellpopulation. Plastikadhärierende Zellen der Makrophagen/Monozytenpopulation werden durch Kultivierung der gereinigten Zellen über Nacht in Gewebekulturflaschen entfernt. Die B-Zellen werden aliquotiert und mit Ebstein Barr Virus-haltigem Überstand der Marmoset Zelllinie, mit 200 μ l einer 5% Sepharose/Protein A-Präparation oder EBV-Überstand plus 1.6 nM TPA (ein Phorbol ester, der Zellen zu Proliferation und verstärkter

Expression von Oberflächenstrukturen anregt) stimuliert. Der Stimulationsdauer beträgt in allen Fällen drei Tage. Danach werden die Zellen durch Zentrifugation gewonnen, in PBS gewaschen und zur Immunfluoreszenzanalyse oder RNS- Präparation verwendet.

4.2.2.5.Kompetenzinduktion von Bakterien

Dieses Protokoll gilt für die Bakterienstämme HB 101, DK 1 und MC 1061. Zur Kompetenzinduktion streicht man die jeweiligen Bakterien am Vortag der Induktion frisch auf eine LB Agarplatte aus und lässt über Nacht bei 37°C hochwachsen. Am nächsten Tag wird eine Einzelkolonie in 5 ml TYM Medium (2% Bacto-Tryptone, 0.5% Bacto-Yeast Extrakt, 0.6 % Natriumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid) angeimpft und nach zwei Stunden bei 37°C und 190 rpm im Bakterienschüttler auf 100 ml aufgefüllt. Die Bakterien werden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.9 angezüchtet, dann eine halbe Stunde auf Eis gestellt und bei 4°C und 600g 10 Minuten abzentrifugiert. Anschließend in 20 ml TFB I Medium (30 mM Kaliumazetat, 50 mM Manganchlorid, 100 mM Kaliumchlorid, 10 mM Kalziumchlorid, 15% Glycerin) resuspendiert und 5 - 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird wiederum abzentrifugiert und vorsichtig in 2 ml TFB II (10 mM Natriummorpholinopropansulfonsäure pH 7.0, 75 mM Kalziumchlorid, 10 mM Kaliumchlorid, 8 % Glycerin) aufgenommen. Diese Suspension wird in vorgekühlte Eppendorfröhrchen zu je 200 µl aliquotiert, im Methanol/Trockeneisbad eingefroren und bei - 80°C gelagert.

4.2.2.6. Transformation von Plasmiden in kompetente

Bakterien

Um möglichst möglichst gute Transformationseffizienzen zu erreichen sollten nicht mehr als 25 ng Vektor in höchstens 10 μ l Volumen zur Transformation eingesetzt werden. Kann diese Faustregel nicht eingehalten werden, sollten unbedingt mehrere getrennte Transformationsansätze parallel durchgeführt werden. Hierzu gibt man zu 100 μ l der kompetenten Bakteriensuspension ein Aliquot des Vektors und inkubiert nach leichtem Durchmischen eine Stunde lang auf Eis in einem 15 ml Rundboden Polypropylenröhrchen. Im Anschluß überführt man die Bakterien für 45 Sekunden in ein 42°C Wasserbad und gibt anschließend einen ml LB Medium, das auf 37°C vorgewärmt wurde hinzu und inkubiert eine weitere Stunde. Danach werden die Bakterien abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 50 μ l LB/Ampizillinmedium aufgenommen und auf eine LB/Ampizillin Agarplatte ausgestrichen. Im Falle der Herstellung einer Genbank werden die Bakterien nicht direkt auf den Agar ausplattiert, sondern auf eine Nitrozellulose, die eine Stunde vorher auf den Agar aufgelegt wurde. Dies ermöglicht es nach dem Hochwachsen der Bakterien Vervielfältigungen (Replika's) durch mehrfachen Abklatsch des Originals herzustellen.

4.2.3. NUKLEINSÄUREARBEITEN

4.2.3.1. Präzipitation von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren werden in Anwesenheit von Salz und Äthanol in der Kälte gefällt. Soweit im Text nicht gesondert erwähnt, wird durch Zugabe von Natriumazetat pH 5.0 ad 0.3M und dem 2.5- fachen Volumen Äthanol bei - 80°C im Falle von RNS und bei 4°C im Falle

von genomischer DNS präzipitiert. Enthält die DNS/RNS- haltige Lösung bereits hohe Salzkonzentrationen, entfällt die gesonderte Salzzugabe. Nach Präzipitation werden gefällte Nukleinsäuren grundsätzlich zweimal mit 70%igem Äthanol gewaschen.

4.2.3.2. Phenolextraktion

Die zu extrahierende Lösung wird mit einem vergleichbaren Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gut vermischt. Die Phasentrennung erfolgt durch eine niedrigtourige Zentrifugation. Daraufhin wird der wässrige, die Nukleinsäuren enthaltende Überstand abgenommen, ohne jedoch die Interphase, die die ausgefällten Proteinverunreinigungen enthält, mitzunehmen. Die Phenolextraktion wird so lange wiederholt, bis keine trübe Interphase mehr gebildet wird.

4.2.3.3. Spot-Test

Dieser Test dient zur schnellen Quantifizierung von geringen Nukleinsäuremengen, die nicht zur Messung im Photometer geeignet sind. Die Sensitivität des Spot-Testverfahrens liegt bei ungefähr $1\mu\text{g/ml}$. Zur Messung wird auf eine 1%ige Agaroseplatte, die $1\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid enthält je ein μl der zu messenden DNS und einer bekannten DNS-Standardverdünnungsreihe aufgetropft. Nach dem Eintrocknen der Tropfen wird die unbekannte Nukleinsäurekonzentration durch Vergleich mit der Fluoreszenzintensität der bekannten DNS Standards bestimmt.

4.2.3.4.Größenauftrennung von DNS in Agarosegelen

Je nach Größe der DNS wählt man eine entsprechende Agarosegelkonzentration: 0.4% Agarose für genomische DNS, 0.7% für gespaltene genomische DNS/Kosmide und 1% für gespaltene Plasmide. Als Laufpuffer dienen TBE oder Loening Puffer. Die im Gel aufgetrennte DNS wird durch Zugabe von Ethidiumbromid zum Laufpuffer sichtbar gemacht (25 ng/ml Ethidiumbromid). Da die Genauigkeit der Auftrennung bei langsamer Auftrennung d.h. niedriger angelegter Spannung größer ist, werden Gele, die zur späteren Hybridisierung verwendet werden sollen, mit nicht mehr als 5V/cm elektrophoretisiert, falls TBE als Laufpuffer verwendet wird. Wird in Loening Puffer aufgetrennt, kann auch eine höhere Spannung angelegt werden.

4.2.3.5.Elektroelution von DNS Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Gewinnung definierter DNS Fragmente (Plasmidinsert u..) werden entsprechend gespaltene DNS Proben wie oben beschrieben im Agarosegel aufgetrennt und unter UV- Licht (340 nm) die gewünschte DNS- Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Agarosestück wird grob zerkleinert und in die Kathodenkammer eines "ISCO Electrophoretic Concentrator's" eingefüllt. Anschließend wird eine Spannung von 100-200 Volt angelegt und für 1-3 Stunden eluiert. Diese Elutionsmethode ist hervorragend für die Rückgewinnung geringer DNS Mengen geeignet, die darüber hinaus noch einen hohen Reinheitsgrad besitzen sollen. Es können Fragmente von 50 bp bis 15 kb gewonnen werden.

4.2.3.6.DNS Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die optimalen Reaktionsbedingungen bezüglich Temperatur, pH, Zusammensetzung- und Konzentration der Salze wurden den jeweiligen Beipackzetteln der Lieferfirma entnommen. In der Regel wurde der Verdau eine Stunde lang durchgeführt. Ergab sich nach einer Analyse auf einem Testgel, daß eine DNS nicht vollständig verdaut wurde, so erfolgte eine weitere Inkubation mit frisch zugefügtem Enzym.

4.2.3.7.Isolierung von DNS

Zur schnellen Isolierung von DNS aus Zellkulturmaterial werden die in PBS gewaschenen Zellen in wenig PBS resuspendiert und mit 10-20 ml GT- Puffer, wie wir ihn auch für die RNS Präparation verwenden, versetzt und eine Stunde lang vorsichtig auf einem Roller bewegt. Anschließend werden 2-4 Phenolextraktionen vorgenommen, der verbleibende wässrige Überstand abgenommen und die DNS präzipitiert, mit 70%igem Äthanol gewaschen und in Wasser oder TE resuspendiert. In der Regel liegt die DNS in einem Reinheitsgrad vor, daß keine separate Proteinasebehandlung durchgeführt werden muß. Die Konzentration und den Reinheitsgrad stellt man durch Messen im Photometer bei 260 nm bzw. 280 nm fest.

4.2.3.8.Plasmidpräparation (Kleinansatz)

In 7 ml LB Medium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt ist, impft man eine Kolonie der gewünschten Bakterien an und läßt diese über Nacht bei 37°C im Schüttler hochwachsen. Nun wird abzentrifugiert und die Bakterien in 200 µl Glukosepuffer (25mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM Glukose) resuspendiert.

Durch Zugabe des zweifachen Volumens einer Natriumhydroxydlösung (0.2 M Natriumhydroxyd, 1% SDS) und vorsichtigem Mischen werden die Bakterien 5 Minuten auf Eis lysiert. Mit 1/3 Volumen 750 mM Kaliumazetat pH 4.5 werden Proteine, Kohlenhydrate, Fette und chromosomale DNS gefällt und durch Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge 13.000 rpm, 15 Minuten) entfernt. Der plasmidhaltige Überstand wird abgenommen, phenolisiert und durch Zugabe des 0.6 fachen Volumens an 2n Propanol präzipitiert. Das Plasmidpellet wird in 70%igem Xthanol gewaschen und in Wasser oder TE resuspendiert und mit RNase A (200 µg/ml EK) eine halbe Stunde lang behandelt. Es wird nochmals phenolisiert und präzipitiert. Die Ausbeute an Plasmid beträgt i.d.R. mehr als 10 µg.

4.2.3.9. Plasmidpräparation (Großansatz)

Während die Plasmid Minipräparation hauptsächlich analytischen Zwecken dient, stellt der Großansatz ein präparatives Verfahren zur Gewinnung großer Plasmidmengen dar.

In einen Liter Bakterienmedium wird eine Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C angezüchtet. Die Bakterien werden abzentrifugiert und in 40 ml Glukosepuffer (s. oben) resuspendiert, mit 80 ml NaOH/SDS lysiert und nach 5 Minuten mit 40 ml Kaliumazetat versetzt. Nach Zentrifugation wird der wässrige Überstand auf Eis mit dem 0.6- fachen Volumen Isopropanol präzipitiert und das Nukleinsäurepellet einmal mit 70%igem Xthanol gewaschen. Dann wird das Pellet in TE gelöst, mit 10 mg Caesiumchlorid und 100 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) versetzt. Diese Lösung füllt man nun in ein Ti 70 Rotor Quicksealröhrchen, verschweißt die Einfüllöffnung und zentrifugiert im Ti 70 bei 400.000 g in der Ultrazentrifuge mindestens 16 Stunden lang. In dem sich ausbildenden Caesiumchloriddichtegradienten werden die

Plasmidbestandteile der Lösung von chromosomaler DNS, RNS und Proteinen getrennt und sind nach Beendigung der Zentrifugation als ringförmige Phase zu erkennen. Diese Phase wird mit Hilfe einer Spritze abgesaugt, 1:3 mit Wasser verdünnt, phenolisiert und präzipitiert. Gewöhnlich erhält man mit dieser Methode Milligrammengen reiner Plasmid DNS.

4.2.3.10. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

A) Nicktranslation von DNS

Zur Hybridisierung von Southern- oder Northernblots benötigt man eine Probe zur Detektion der spezifischen Banden. Diese kann durch Nicktranslation einer DNS Probe hergestellt werden. Man setzt dazu bis zu 100 ng DNS ein, versetzt mit 10- - fach Nicktranslationspuffer (0.5 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.1 M Magnesiumsulfat, 1 mM DTT, 500 µg/ml BSA), je 10 µM dTTP und dGTP, je 10-20 µCi ^{32}P -dATP und ^{32}P -dCTP, 1 ng/ml DNase I und 0.4 Einheiten/µl Reaktionsansatz endonukleasefreie DNS Polymerase I. Der Reaktionsansatz wird eine Stunde bei 15°C inkubiert und mit 100 µl TES (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.1% SDS) gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide werden über eine Sephadex G- 50 Spinsäule entfernt. Man erhält gewöhnlich eine Markierung mit mehr als 10^6 cpm/µg eingesetzter DNS.

B) Polypriming von DNS

Eine attraktive Alternative zur Nicktranslation ist das DNS Polypriming. Es hat den Vorteil, daß nur ein radioaktives Nukleotid zur Markierung eingesetzt werden muß; die zu markierende DNS 10fach stärker markiert wird und größere radioaktiv markierte Stücke entstehen, was sich positiv auf die Hintergrundhybridisierung auswirkt. Außerdem können noch relativ kurze DNS Sonden markiert werden, für die eine Nicktranslation ungeeignet ist.

Beim Polypriming setzt man 10-50 ng DNS in einem Volumen von 32.5 μ l ein. Die DNS wird bei 95°C fünf Minuten lang denaturiert, falls die DNS als Doppelstrang vorliegt, und auf Eis abgekühlt. Anschließend gibt man 10 μ l Oligomarkierungspuffer zu (je 100 mM dATP, dGTP und dTTP, 125 mM Tris-HCl pH 8.0, 125 mM Magnesiumchlorid, 10 mM 2-Merkaptoäthanol, 0.5 M HEPES pH 6.6, 4 μ g/ml Polyprimeroligonukleotide), 2 μ l BSA (10 mg/ml), 5 μ l γ -³²P-dCTP und 2 Einheiten Klenow Fragment der DNS Polymerase I hinzu. Diesen Ansatz läßt man 2- 3 Stunden bei Zimmertemperatur reagieren und reinigt anschließend über eine Sephadex G- 50 Spinsäule auf.

4.2.3.11.Endmarkierung von Nukleinsäuren

A) Endmarkierung mit Klenow Fragment

Radioaktive Proben können auch hergestellt werden, indem man die Eigenschaft bestimmter Restriktionsendonukleasen 5' vorstehende DNS Enden zu bilden, ausnutzt. Am 3' Ende kann die Klenowpolymerase ansetzen und die fehlenden Nukleotide komplementär zum vorstehenden 5' Ende auffüllen. Setzt man hierfür radioaktive Nukleotide ein, so erhält man einen DNS Strang, der an

seinem 3' Ende radioaktiv markiert ist. Dieses Verfahren ist eine unbedingte Erfordernis zur Maxam & Gilbert Sequenziermethode. Die Klenowreaktion wird 15 Minuten bei 37°C mit 2-5 Einheiten Klenow Polymerase in Nicktranslationspuffer durchgeführt. Freie Nukleotide werden über eine Sephadex G- 50 Säule abgetrennt.

B) Markierung von Oligonukleotiden mit $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP

Nicht immer stehen zur Southern- oder Northernblotanalyse geeignete DNS Doppelstrangproben vor. Als Ausweichmöglichkeit empfiehlt es sich mit *in vitro* synthetisierten Oligonukleotiden zu arbeiten. Diese liegen als Einzelstrang vor und können mit $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP und Polynukleotid Kinase radioaktiv markiert werden. Das Reaktionsvolumen sollte möglichst klein gehalten werden, um eine effektive Markierung zu erreichen. Zu 100 ng Oligonukleotid gibt man 50 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP, 10 Einheiten T4 Polynukleotid Kinase und eine entsprechende Menge 5- fach Reaktionsmix (0.25 M Tris-HCl pH 7.6, 50 mM Magnesiumchlorid, 25 mM DTT, 250 $\mu\text{g/l}$ BSA). Die Reaktion wird eine Stunde lang bei 37°C durchgeführt, anschließend mit 100 μl TES gestoppt und über eine G- 50 Säule gereinigt.

4.2.3.12.Southernblot

Mit Restriktionsenzymen gespaltene DNS (10 μg bei genomischer DNS und 100 ng bei definierten Fragmenten) wird zuerst in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird nach Beendigung des Laufes unter UV Licht mit einem Längenstandard abfotografiert und anschließend 20 Minuten lang in 0.2 N Salzsäure inkubiert. Dies bewirkt eine leichte Degurinierung der DNS und ermöglicht so einen besseren Transfer von hochmolekularen DNS Fragmenten. Während weiterer Inkubation in 0.5 M

Natriumhydroxyd/ 1.5 M Natriumchlorid für 40 Minuten wird die DNS denaturiert und anschließend mit 0.5 M Tris-HCl pH 7.4/ 3 M Natriumchlorid 40 Minuten lang neutralisiert. Nach Beendigung dieser einzelnen Schritte wird das Gel jeweils gründlich mit Wasser gespült. Der Blotting Aufbau entspricht dem unter der Sektion Western- oder Northernblot beschriebenen Verfahren. Der Transfer erfolgt für genomische DNS über Nacht. Wurde Plasmid DNS gespalten, so können an dieser Stelle Mehrfachabzüge produziert werden. Hierzu sind folgende Transferzeiten einzuhalten: 20, 10, 10 und 60 Minuten. Zur Fixierung der übertragenen DNS auf den Filtern werden diese 2 Stunden bei 65°C gebacken.

4.2.3.13. Fixierung der DNS von Bakterienkolonien auf Trägerfolie

Im Falle von Replikaplattierungen ist es von Vorteil die, auf der Trägerfolie hochgewachsenen Bakterienkolonien direkt auf ihrer Unterlage zu fixieren, um ein Auffinden von positiven Bakterienkolonien später zu erleichtern. Dazu werden die Filter durch, mit dem Original übereinstimmenden Einstichmarkierungen versehen und nach dem Hochwachsen der Kolonien 4 Minuten lang auf Whatman 3 MM Papier gelegt, welches mit 0.5 M Natriumhydroxyd getränkt ist. Die Bakterien werden dadurch lysiert und die DNS auf der Trägerfolie immobilisiert. Anschließend Inkubation der Filter für weitere 4 Minuten auf 1 M Tris-HCl pH 7.5 getränktem Whatman Papier und 10 Minuten lang in 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M

Natriumchlorid, dient der Neutralisation der Filter. Zurückgebliebene Bakterienreste werden in 2xSSC, 0.1% SDS abgewaschen. Dann wird kurz in 2xSSC gespült und für 2 Stunden bei 65°C hitzefixiert.

4.2.3.14. Hybridisierung von Zellulosefiltern und Nylonmembranen

Zur Gendetektion auf filtergebundener DNS mit radioaktiven Proben werden die Filter zunächst in 2xSSC angefeuchtet und in einer Plastiktüte mit 10 ml Hybridisierungsmix (3xSSC, 10x Denhardt's, 0.01 % Tetra-Natriumdiphosphat-10-Hydrat, 0.1% SDS, 10% Dextransulfat, 50 µg/ml Heringssperma DNS) eingeschweißt und zunächst 1- 2 Stunden bei 65°C im Schüttelwasserbad vorhybridisiert. Die radioaktiv markierte Probe wird, falls sie als Doppelstrang DNS vorliegt, 5 Minuten lang bei 95°C denaturiert und auf Eis gestellt. Nach erfolgter Prähybridisierung wird sie zusammen mit 10 ml frischem Hybridisierungsmix gegen den Prähybridisierungsmix ausgetauscht. Die Hybridisierung läuft über Nacht bei 65°C. Nicht spezifisch gebundene Radioaktivität wird durch nachfolgende Waschvorgänge unterschiedlicher Stringenz entfernt. Das Waschprotokoll stellt sich wie folgt dar: je dreimal Waschen bei 65°C für 15 Minuten in

3- fach SSC mit 0.1% SDS

1- fach SSC mit 0.1% SDS

0.3- fach SSC mit 0.1% SDS und, falls erforderlich,

0.1- fach SSC mit 0.1% SDS.

Nach jedem Waschvorgang wird der unspezifische Hintergrund mit einem Monitor überprüft. Die Filter werden luftgetrocknet und die Autoradiographie mit Signalverstärkerfolien auf XAR Röntgenfilm bei - 80°C durchgeführt.

4.2.3.15. Hybridisierung mit Oligonukleotiden

Die Hybridisierungsbedingungen für Oligonukleotide unterscheiden sich aufgrund instabileren Hybridisierung der Oligonukleotide zum oben aufgeführten Protokoll. Die Hybridisierungstemperatur ergibt sich nach der Faustregel: $(\text{Anzahl der dGTP/dCTP Paare} \times 4) + (\text{Anzahl der dATP/dTTP Paare} \times 2) - 10 = \text{Hybridisierungstemperatur}$. Meistens liefert diese Berechnung jedoch zu hohe Temperaturangaben. Deshalb wurde für die 36^{mer} Oligonukleotide eine sequentielle Hybridisierung bei über Nacht von 65°C auf 55°C abfallenden Temperaturen vorgenommen. Beim Erreichen der adäquaten Temperaturen hybridisieren die Oligonukleotide dann spezifisch an die entsprechenden DNS Abschnitte. Als Hybridisierungsmix wird 7% SDS, 10x Denhard's, 10% Dextransulfat, 20 mM Natriumphosphat pH 7.0, 5xSSC, 100 µg/ml Heringssperma DNS benutzt. Es wird eine Stunde lang prähybridisiert. Das Aufkochen der radioaktiv markierten Oligonukleotide zwecks Denaturierung entfällt. Die Waschvorgänge nach erfolgter Hybridisierung sollten kurz gehalten werden (5-10 Minuten), um eine zu starke Abschwächung des spezifischen Signals zu vermeiden. Nach jedem Waschvorgang wird der unspezifische radioaktive Hintergrund der Filter gemessen. Als Waschlösung dient 5% SDS, 20 mM Natriumphosphat pH 7.0, 10x Denhard's, 3xSSC; gewaschen wird bei 55°C im Schüttelwasserbad.

4.2.3.16. Subklonieren in M13 Phagen und Dideoxy- Sequenzieren

Zum Sequenzieren mit der Dideoxy- Methode nach Sanger (Sanger 1975 und 1977) werden zu sequenzierende DNS Fragmente in ds Phagen (die replikative Form der mp Vektoren) inseriert. DNS Fragment und Vektor müssen dabei mit Restriktionsenzymen gespalten sein, die identische oder kompatible Spaltstellen liefern. Die Kopplung von

Fragment und Vektor wird durch die T4 DNS Ligase katalysiert und in einem Reaktionsvolumen von 10 μl durchgeführt. 100 ng DNS Fragment und 20 ng Vektor DNS werden gemischt und mit 0.01 Einheiten Enzym in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM Natriumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 1 mM ATP, 5 mM DTT bei 15°C mindestens 3 Stunden inkubiert. Ligationen mit glatten DNS Enden werden über Nacht inkubiert. Ligierte DNS Fragmente werden in kompetente JM101 Bakterien transformiert. Die Kompetenzinduktion geschieht folgendermaßen: von einer JM101 Übernachtskultur wird eine 1:100 Verdünnung in 2xTY Medium (1.6% Bacto Tryptone, 1% Hefeextrakt, 1% Natriumchlorid) hergestellt und bis zu einer Dichte von $\text{OD}_{550} = 0.3$ gezogen. Nach Abkühlen und Zentrifugieren werden die Bakterien in einem halben Ausgangsvolumen kalter 50 mM Kalziumchloridlösung aufgenommen, 20 Minuten auf Eis inkubiert, erneut abzentrifugiert und in 1/10 Volumen derselben Lösung resuspendiert.

Zu 200 μl dieser Zellauspension werden 5 μl Ligationsansatz gegeben und auf Eis eine Stunde inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt bei 42°C drei Minuten lang. Danach werden 250 μl einer JM101 Suspension zugegeben (1:100 Verdünnung der Übernachtskultur, eine Stunde bei 37°C hochgewachsen). Als Farbindikatoren für erfolgreiche Transformation werden 50 μl einer 2%igen Bluo- Gal Lösung in Dimethylformamid und 10 mg IPTG in Wasser gelöst zu 3 ml flüssigem H Top Agar (42°C) gegeben, gut gemixt und mit den transformierten Bakterien versetzt, dann auf H- Agarplatten ausgegossen und verteilt. Nach der Übernachtskultur der Platten bei 37°C stellen sich positive Phagen, d.h. Phagen mit DNS Insert als durchsichtige Plaques dar, solche ohne Insert als blaue Plaques. Dies ist bedingt durch das Konstruktionsprinzip der Vektoren, die bei Anwesenheit von IPTG die Synthese der β - Galaktosidase ermöglichen. Dies aber nur dann, wenn das zur Synthese erforderliche Gen nicht durch ein Insert unterbrochen ist; eine

Farbreaktion ist dann aufgrund der fehlenden Synthese von Enzym nicht möglich.

Wird ein durchsichtiger Plaque in eine JM101 Bakterienkultur angeimpft und mehrere Stunden inkubiert, können die M13 Phagen Bakterien befallen und sich vermehren. Vermehrtes Virus wird als Einzelstrangphage ins Kulturmedium sezerniert und kann daraus gewonnen werden (s. Sequenzierhandbuch zum M13 Sequenzieren von Amersham).

Die Sequenzierung der ssPhagen- DNS beruht auf einer enzymatischen Synthesereaktion mit Polymerase I (Klenowfragment), die ausgehend von einem Primer, der 3' vom DNS Insert im Phagenpolylinkerbereich ansetzt, einen komplementären Strang synthetisiert.

Unterbrochen wird die Synthesereaktion immer dann, wenn ein dem Reaktionsgemisch zugesetztes dideoxy- NTP Analog eingebaut wird. Damit ist eine weitere Strangverlängerung blockiert. Aus der Kombination dieses Verfahrens für alle vier Nukleotide läßt sich auf einem Polyacrylamidgel die Sequenz des jeweiligen Inserts lesen. Die dazu erforderlichen Reaktionen sehen wie folgt aus: zu 100 ng (5µl) ssDNS gibt man 1.2 ng Primer, 10- fache Klenow Puffer (100mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM Magnesiumchlorid) ad 1.5- fache und inkubiert eine Stunde bei 60°C. Anschließend werden diesem Ansatz 35 µCi ³²S-dATP und 10 Einheiten Klenow Polymerase zugefügt und gut gemischt. Dieser Mix wird gleichmäßig auf vier Reaktionsansätze (einen für jedes Nukleotid) verteilt. Hierzu kommen nun jeweils 2 µl eines Nukleotidgemisches, welches ein Nukleotid und sein dideoxy Analog in einem definierten Verhältnis enthält:

- A spezifische Reaktion

dATP : ddATP = 4 µM : 50 µM

- C spezifische Reaktion

dCTP : ddCTP = 4 µM : 25 µM

- G spezifische Reaktion

dGTP : ddGTP = 4 μ M : 50 μ M

- T spezifische Reaktion

dTTP : ddTTP = 4 μ M : 250 μ M

Die nicht kompetitiven Nukleotide sind zu jeweils 80 μ M vertreten.

Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur 20 Minuten lang, gefolgt von einer Chasereaktion (Zugabe von 2 μ l Chaselösung, die dNTP's in 0.5 mM Konzentration enthält) für weitere 20 Minuten. Gestoppt wird durch Zugabe von 4 μ l Formamidprobenpuffer (20 mM EDTA in deionisiertem Formamid, 0.03% Bromphenolblau und Xylencyanol). Vor Auftrag der Proben auf das Sequenziergel werden die Reaktionsansätze 3 Minuten bei 95°C denaturiert.

4.2.3.17. Maxam & Gilbert Sequenzierprotokoll

Zur Maxam & Gilbert Sequenzierung (Maxam 1977 und 1980) werden DNS Fragmente in einem Enzymdoppelverdau derart gespalten, daß je ein 5' überstehendes Fragmentende entsteht und ein Glattes oder 3' überstehendes. Das 5' Ende wird wie beschrieben mit radioaktiven Nukleotiden in einer Klenow Polymerasereaktion markiert. Von der markierten Fragmentseite aus wird sequenziert durch spezifische, nur partiell herbeigeführte chemische Modifikation der Nukleotidbasen, die diese für eine anschließend durchgeführte Spaltung der Bindungen mit Piperidin zugänglich macht.

Die jeweils durchgeführten spezifischen Reaktionen induzieren Strangbrüche an G's, A+G's, C's, C+T's.

- G Reaktion

3 μ l markierte DNS

1 μ l Heringssperma DNS (10 mg/ml; ultraschallbehandelt)

6 μ l Wasser

1 μ l Blue Dextran 5%ig

10 μ l DMS (1:90.000 verdünnt in DMS Puffer)

Die Reaktionszeit beträgt 15 Minuten bei 60°C

- A + G Reaktion

3 μ l markierte DNS

1 μ l Heringssperma DNS

6 μ l Wasser

1 μ l Blue Dextran

10 μ l Ameisensäure (0.2 M)

Die Reaktionszeit beträgt 5 Minuten bei 37°C

- C spezifische Reaktion

3 μ l markierte DNS

1 μ l Heringssperma DNS

3 μ l Wasser

3 μ l Natriumazetat (6 M)

1 μ l Blue Dextran

10 μ l Hydrazin

Reaktionszeit: 2 Minuten bei Raumtemperatur

- C + T Reaktion

3 μ l markierte DNS

1 μ l Heringssperma DNS

6 μ l Wasser

1 μ l Blue Dextran

10 μ l Hydrazin

Reaktionszeit : 2 Minuten bei Raumtemperatur

Zur Entfernung des Hydrazins, welches die anschließende Piperidinspaltung verhindern würde, werden die beiden letztgenannten Reaktionen mit 1-Butanol dreimal gewaschen, vakuumgetrocknet und in 25 μ l Wasser resuspendiert. Die Piperidinspaltung ist für alle Reaktionsansätze identisch und wird folgendermaßen durchgeführt:

Zu jeder Reaktion gibt man 25 μ l 2 M Piperidin und inkubiert bei 90°C 15 Minuten lang. Anschließend wird dreimal mit 1- Butanol und einmal mit Äthanol gewaschen. Nach erfolgter Vakuumtrocknung wird in 10 μ l Formamidprobenpuffer resuspendiert.

4.2.3.18. Auftrennung von Sequenzierreaktionen

Die Auftrennung der Sequenzieransätze erfolgt auf denaturierenden 6%igen Polyacrylamidgelen von 0.4 mm Dicke und 40 cm Länge. Denaturierendes Agens ist Harnstoff (7 M). Silikonisierung einer der beiden Glasplatten, zwischen denen das Gel gegossen wird, ermöglicht ein leichtes Ablösen dieser Glasplatte nach der Auftrennung der Proben. Das auf der anderen Platte adhärierende Gel wird mit der Glasplatte in 10%iger Essigsäure 20 Minuten zur Herauslösung des Harnstoffes inkubiert und anschließend im 60°C Trockenschrank auf die Glasplatte aufgetrocknet.

Die Elektrophorese der Proben erfolgt bei 1600 V- 1800 V für 5 Stunden mit gestaffeltem, mehrfachen Probenauftrag, um möglichst viele Sequenzdaten zu erhalten.

Getrocknete Gele werden zwei Tage ohne Intensivierfolie exponiert.

4.2.4.RNS ARBEITEN

Generell gilt für das Arbeiten mit RNS Präparationen und deren Gewinnung ausschließlich mit autoklavierten Puffern und Lösungen zu arbeiten.

4.2.4.1.RNS Isolierung aus Einzelzellsuspensionen

Die verwendete Guanidin/Caesiumchlorid Methode ist aufgrund der extrem chaotropen Wirkung des Guanidinisothiozyanats auf Proteine besonders geeignet RNS Abbau durch RNase Aktivität zu verhindern. In wenig PBS resuspendierte Zellen werden mit einem mindestens fünffachen Volumen GT- Puffer (4 M Guanidinisothiozyanat, 25 mM Trinatriumzitraddihydrat, 0.5% Natriumlaurylsarkosin, 100 mM 2-Merkaptoäthanol) vermischt und unter Mithilfe eines Vortex-Mischers gut lysiert (Ullrich 1977). Das Homogenat wird in einem SW 40 Zentrifugenröhrchen auf einen Caesiumchloridgradienten überschichtet, der sich wie folgt aufbaut: zuunterst 2ml 5.7 M Caesiumchlorid gefolgt von je 2 ml 40%igem und 30%igem Caesiumchlorid (Glisin 1974). Zentrifugiert wird bei 15°C, 16 Stunden bei 35.000 rpm in einem Beckman SW 40 Rotor in der Ultrazentrifuge. Die sedimentierte RNS stellt sich als durchsichtiges, solides Pellet am Röhrchenboden dar. Die darüber befindliche DNS- und proteinhaltige Lösung wird verworfen; die RNS in Wasser gelöst und einmal phenolisiert. Anschließend wird die RNS über Nacht mit 2.5- fachem Volumen Äthanol bei - 80°C präzipitiert und 15 Minuten in einer Eppendorffzentrifuge auf

höchster Stufe abzentrifugiert. Das RNS Pellet wird zweimal mit 70%igem Äthanol gewaschen und in sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt im Photometer bei 260 nm.

4.2.4.2.RNS- Gelelektrophorese und Transfer auf Trägerfolien (Northernblot)

Zur Auftrennung von RNS in Agarosegelen werden 1,2 g Agarose in einer 100 ml Flasche mit 60 ml destilliertem Wasser versetzt und autoklaviert, nachfolgend mit 10 ml MOPS Puffer (0.2 M Morpholinopropanesulfonsäure pH 7.0, 50 mM Natriumazetat, 5 mM EDTA pH 8.0) und Formaldehyd (2.2 M) versetzt, auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt und als Gel gegossen. 4.5 µl RNS (bis zu 30 µg) werden mit 1 µl 10- fache MOPS Puffer, 3.5 µl Formaldehyd (12.3 M) und 10 µl deionisiertem Formamid versetzt. Die Probenmischung wird 15 Minuten bei 56°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 2 µl Probenpuffer (50% Glyzerin, 1 mM EDTA, 0.4% Bromphenolblau) versetzt. Nach Auftrag der Proben trennt man die RNS bei konstanten 25 Volt Spannung über Nacht im 1x MOPS Puffer auf.

Derart aufgetrennte RNS wird ohne spezielle Weiterbehandlung des Gels zum Blotten verwendet. Das Gel wird auf eine Glasplatte gelegt, die mit einem in 20xSSC getränktem Whatman 3 MM Papier belegt ist. Die Glasplatte steht dabei in einem mit 20xSSC gefüllten Behälter in den die überstehenden Enden des Whatmanpapiers eintauchen. Auf das Gel wird nun eine Nitrozellulose oder Nylonmembran aufgelegt und mit einem weiteren in 20xSSC angefeuchteten Whatmanpapier abgedeckt. Darauf werden mehrere Lagen saugfähiges Papier geschichtet, das oben mit einem Gewicht beschwert wird. Der Transfer der RNS auf die Trägerfolie erfolgt nun mit dem aufsteigenden Flüssigkeitsstrom und sollte

mindestens 6 Stunden lang durchgeführt werden. Im Anschluß nimmt man die Trägerfolie ab, wäscht kurz in 2xSSC und bäckst bei 65°C zwei Stunden lang. Die RNS ist nun irreversibel an die Trägermembran gebunden und kann zum Hybridisieren verwendet werden.

4.2.4.3.cDNS Synthese und Klonierung

Der Zustand der RNS die zur cDNS Synthese eingesetzt wird ist von entscheidender Bedeutung für die Qualität der resultierenden cDNS. Unnötige Handhabungen der RNS wurden deshalb vermieden, wie z.B. das Isolieren der polyA⁺ RNS; nicht zuletzt aber auch wegen der geringen verfügbaren Mengen RNS aus der MF T Zell Leukämie. Für die Reaktion wurden 50 µg Total- RNS eingesetzt und mit Quecksilberhydroxyd (1.25 mM) für 20 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert. Überschüssiges Quecksilberhydroxyd wird mit 2-Merkaptoäthanol (100 mM) bei Raumtemperatur für zwei Minuten abreagiert. Die Synthese des ersten cDNS Stranges findet bei 42°C statt (Gubler 1983). Der denaturierten RNS setzt man folgende Reagenzien zu:

2 Einheiten RNasin, ein RNaseinhibitor

500 mM Tris-HCl pH8.3

40 mM Magnesiumchlorid

je 0.5 mM dNTP's

4 µg oligo dT₍₁₂₋₁₈₎, Primer

50 Einheiten AMV- Reverse Transkriptase.

Der Reaktionsansatz wird mit sterilem, destilliertem Wasser auf 40 µl aufgefüllt und 90 Minuten inkubiert. Alle molaren Angaben beziehen sich auf Endkonzentrationen. Bei der Synthese des ersten Stranges wurde auf die Zugabe von radioaktiv markierten

Nukleotiden verzichtet, um eine Zerstrahlung der synthetisierten cDNS besonders nach längerer Lagerung zu vermeiden.

Durch Zugabe des einfachen Volumens an Natriumhydroxyd (0.2 M) wird die Reaktion gestoppt und nachfolgendes Überführen in ein 70°C Wasserbad bewirkt die alkalische Hydrolyse des RNS Templates. Die Hydrolyse wird 20 Minuten lang durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wird durch Zugabe von 0.2 Volumen 1 M Salzsäure neutralisiert und über eine Sephadex G- 50 Spinsäule aufgereinigt. Das Eluat enthält die synthetisierte einzelsträngige cDNS (ss cDNS) frei von Salzen und nicht inkorporierten Nukleotiden bzw. RNS- Hydrolyseprodukten.

Zur Synthese des zweiten cDNS Stranges nutzt man die Eigenschaft der ss cDNS, am 5' Ende einen sogen. "hairpin- loop" zu bilden, der in der darauffolgenden Reaktion als Primer genutzt werden kann (Okayama 1982). Zum ss cDNS Eluat gibt man 40 µl 5- facher Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM Magnesiumchlorid, 50 mM Ammoniumsulfat, 500 mM Kaliumchlorid, 250 µg/ l BSA, 50 mM DTT und je 200 µM dNTP's) und füllt mit sterilem, destilliertem Wasser auf 200 µl auf. Nach Zugabe von 15 Einheiten Klenow Fragment inkubiert man die Reaktion bei 42°C. drei Stunden lang, phenolisiert anschließend und reinigt über eine Sephadex G- 50 Säule.

Ein erfolgreiches Klonieren von cDNS Doppelstrang ist nur möglich wenn jeweils glatte Doppelstrangenden vorliegen. Dies bedeutet, daß der "hairpin-loop" abgespalten werden muß. Diese Reaktion wird von der S1 Nuklease ausgeführt, die bevorzugt einzelsträngige DNS abbaut, aber auch, falls zu aktiv eingesetzt, Doppelstrang abbauen kann. Die Menge an einzusetzender S1 Nuklease muß daher sorgfältig ausstitriert werden. Als optimierte Bedingungen ergaben sich nachfolgend beschriebene Reaktionsbedingungen: zum ds cDNS Eluat gibt man 20 µl 10- facher S1 Puffer pH 4.5 (2 M Natriumchlorid, 0.5 M Natriumazetat, 10 mM Zinksulfat, 5% Glyzerin), 0.1 Einheit/ l

1

Reaktionsvolumen 51 Nuklease und füllt auf 200 µl Reaktionsvolumen auf. Die Reaktion wird 15 Minuten lang bei 37°C durchgeführt und durch Zugabe von EDTA (10 mM) gestoppt. Die Aufreinigung und Konzentrierung der cDNS erfolgt über eine EluTip- D Säule. Die Menge der erhaltenen cDNS wird durch einen Spot-Test ermittelt.

Zur Klonierung der cDNS verwenden wir einen dG- getailten Vektor. Dies bedeutet, daß die cDNS die komplementären dC- Tails erhalten muß, was durch ein Homopolymertailing geschieht, das durch das Enzym Terminale Transferase katalysiert wird. Da es sich beim dC- Homopolymertailing nicht wie beim dG- Tailing um einen selbstlimitierenden Prozess handelt und zu lange dC Enden ein instabiles Verbinden von cDNS und Vektor bewirkt, müssen auch hier die Reaktionsbedingungen ausgetestet werden.

Die Tailingreaktion wird mit einer Menge an cDNS durchgeführt, die bis zu 25 pMol freie 3' Enden betragen kann (1 pMol 3' Enden entspricht bei durchschnittlicher Länge der cDNS von 1 kb 0.3 µg cDNS). Zu 25 µl des cDNS werden 140 mM Kaliumkakodylat pH 7.0, 1.2 mM 2-Merkaptoäthanol, 10 µM dCTP und 1 mM Kobaltchlorid gegeben, 15 Minuten lang bei 15°C äquilibriert und anschließend 20 Einheiten Terminale Transferase zugegeben und auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktion läuft bei 15°C eine Stunde lang und wird durch Phenolisieren gestoppt. Im Anschluß wird zweimal mit Äther extrahiert, und nach Alkoholpräzipitation wird die gefällte, getailte cDNS in 170 µl Wasser resuspendiert.

Als nächster Schritt findet das Verbinden der getailten cDNS mit dG- getailten pUC 9 Vektor statt (Annealingreaktion). Dazu gibt man zu den 170 µl dC- getailter cDNS 10 µl dG- getailten Vektor. Dies entspricht einer Menge von 25 ng Vektor. Entscheidend für die Ausbeute an annealtem cDNS ist das Verhältnis von cDNS:Vektor, das zwischen 2:1 bis 5:1 liegen sollte. Des weiteren werden 20 µl Annealing Puffer zugefügt (1 M Natriumchlorid, 100 mM Tris-HCl pH

Annealing Puffer zugefügt (1 M Natriumchlorid, 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA). Die Reaktionsmischung wird nun sequentiell inkubiert für 10 Minuten bei 70°C, 90 Minuten bei 56°C, 90 Minuten bei 42°C und 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Vor Transformation der annealten cDNS zur Etablierung der cDNS Genbank wird eine Testtransformation mit 1 μ l Annealingansatz durchgeführt, was einer eingesetzten Menge von 1,25 ng Vektor entspricht. Durch Auszählen der erhaltenen Bakterienkolonien kann die Transformationseffizienz für die cDNS ermittelt werden. Sie sollte über 10^6 Transformanten/ μ g Vektor liegen.

LITERATURANGABEN

- BARRE-SINOUSSE F., Cherman J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Montagnier L.: Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS.
Science 220:868-871 1983
- BERNARD O., Hozuni H., Tonegawa S.: Sequences of mouse Ig light chain genes before and after somatic changes.
Cell 15:1133-1144 1978
- BLANDEN R.V. und Ada G.L.: A dual recognition model for cytotoxic T cells based on thymic selection of precursors with low affinity for self H-2 antigens.
Scand.J.Immunol. 7:181-190 1978
- BREINL F., Haurowitz J.: Chemische Untersuchung des Präzipitats aus Hämoglobin und Anti- hämoglobin Serum und Bemerkungen über die Natur der Antikörper.
Hoppe- Seyler's Z. physiol. Chem. 192: 45-63 1930
- BRENNER M.B., Trowbridge I.S., Strominger J.L.: Crosslinking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype β subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit.
Cell 40: 183-190 1985
- CACCIA N., Bruns G.A.P., Kirsch I.R., Hollis G.F., Bertness V., Mak T.W.: The T cell receptor α chain genes are located on chromosome 14 at 14q11- 14q12 in humans.
J.Exp.Med. 161: 1255-1259 1986
- CAVAILLE-COLL M., Messiah A., Klatzman D.: Critical analysis of T cell subsets and function evaluation in patients with persistent generalized lymphadenopathy in groups at risk for AIDS.
Clin.Exp.Immunol. 57: 511-518 1984
- CANTOR H. und Boyse E.A.: Functional subsets of T lymphocytes and their cooperations.
J.exp.Med. 141: 1391-1397 1975
- CHEN I.S.Y.: Regulation of AIDS virus expression
Cell 47: 1-2 1986
- CHEN L., Mahul D.M., Bach F.H., Dausset J., Bensussan A., Sasportes M.: Recombinant interferon can induce rearrangement of T cell antigen receptor α -chain genes in vitro.
Proc.Natl.Acad.Sci. 83: 4887-4889 1986
- CHEN L., Mahul D.M., Degos L., Bensussan A.: What is a T Cell clone? Effect of rIFN on T cell clone function and TCR rearrangement.
Hum.Immunol. 17: 214-223 1986
- CONCANNON P., Pickering L.A., Kung P., Hood L.: Diversity and structure of human T cell receptor β chain variable region genes.
Proc.Natl.Acad.Sci. 83: 6598-6602 1986

DALGLEISH A.G., Beverley P.C.L., Claphan P.R., Crawford D.H., Greaves M.F., Weiss R.A.: The CD4 antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-766 1984

DAUSSET J.: Iso- leuco- anticorps. *Acta haemat.* 20: 156 1958

DAUSSET J., Ivanyi P., Ivanyi D.: Tissue alloantigens in human, identification of a complex system. *Histocompatibility Testing* 1965 pp 51 Munksgaard Copenhagen.

DAVIES A.J.S.: The thymus and cellular basis of immunity. *Transpl.Rev.* 1: 43-67 1969

EISEN H.N.: Why affinity progression of antibodies during immune responses is probably not accompanied by parallel changes in the Ig- like antigen specific receptors on T cells. *Bio-Essays* 4: 269-273 1986

O'FARRELL P.H.: High resolution one and two dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 250: 4007-4021 1975

FIGUEROA F. and Klein J.: The evolution of MHC class II genes. *Immunology Today* 7: 78-85 1986

FUNKE I., Hahn A.W.A., Rieber P., Weiss E., Riethmüller G.R.: The cellular receptor (CD4) of the human immunodeficiency virus is expressed on neurons and glial cells in human brain. *J.Exp.Med.* paper in press April 1987

GARTNER S., Markovits P., Markovits D.M., Kaplan M.H., Gallo R.C., Popovic M.: The role of mononuclear phagocytes in HTLV III/LAV infection. *Science* 233: 215-219 1986

GLISIN V.R., Crkvenjakov R., Byus C.: RNA isolated by caesiumchloride centrifugation. *Biochemistry* 13: 492-503 1974

GOLD D.P., Puck J.M., Petty C.L.: Isolation of cDNA clones encoding the 20K non- glycosylated polypeptide chain of the human T cell receptor/T3 complex. *Nature* 321: 431-434 1986

GOTTlieb M., Schroff H.M., Schanker R., Weisman J.D., Fan P.T., Wolf R.C., Saxon A.: Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N.Engl.J.Med.* 305: 1425-1429 1981

GREAVES M.F., Janossy G., Curtis P.: Purification of human T Lymphocytes using nylon fibre columns. *In vitro methods in cell mediated tumor immunity* p.217 Acad. Press 1976

- GREAVES M.F., Mitzutani S., Furley A.J.W., Sutherland D.R., Chan L.C., Ford A.M., Molgaard H.V.: Differentiation- linked gene rearrangement and expression in acute lymphoblastic leukemia
Clin.Haematol. 15: 621-639 1986
- GUBLER R. und Hoffman B.J.: A simple and very efficient method for generating cDNA libraries.
Gene 25: 263-268 1983
- GURNEY M.E., Heinrich S.P., Lee M.R., Yim H.S.: Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotropic factor for spinal and sensory neurons.
Science 234: 566-574 1986
- GURNEY M.E., Apatoff B.R., Spear G.T., Reder A.T.: Neuroleukin: A lymphokine product of lectin stimulated T cells.
Science 234: 574-581 1986
- GYCERKEY F., Melnick J.C., Sinkovics J.G., Gyorkey P.: Retrovirus resembling HTLV in macrophages of patients with AIDS.
The Lancet p.(106) 1985
- HAASE A.T.: Pathogenesis of lentivirus infections.
Nature 322: 130-136 1986
- HANNUM C., Freed J.H., Tarr G., Kappler J., Marrack P.: Biochemistry and distribution of the T cell receptor.
Immunol.Rev. 81: 161-176 1984
- HASELTINE W., Patarca R.: AIDS virus and scrapie protein agent share protein
Nature 323: 115-116 1986
- HEDRICK S.M., Cohen D.L., Nielsen E.A., Davis M.M.: Isolation of cDNA clones encoding T cell specific membrane associated proteins.
Nature 308: 149-153 1984
- HOOD L., Kronenberg M., Hunkapillar T.: T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family.
Cell 40: 225-229 1985
- HONJO T., Kataoka T.: Organisation of Ig heavy chain genes and allelic deletion model.
Proc.Natl.Acad.Sci. 75: 2140- 2144 1978
- HOXIE J.A., Alper J.D., Rackovski J.C., Huebner K., Haggerty D.S., Cedarbaum A.J., Reed J.C.: Alterations in T4 protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV.
Science 234: 1123-1127 1986
- JANZER R.C., Raff M.C.: Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells
Nature 325: 253-257 1987
- JERNE N.K.: Towards a network theory of the immune system.
Ann.Immunol. 125 C: 373-389 1973
- KATAOKA T., Kawakami T., Takahashi N., Honjo T.: Rearrangement of immunoglobulin gamma one chain gene and mechanism for heavy chain class switch.

Proc.Natl.Acad.Sci. 77: 919-923 1980

KATZ I.R., Krown S.E., Safal M.D., Oettgen H.E., Hoffman M.C.:
Antigen specific and polyclonal B cell responses in patients with
AIDS.
Science in press

KIKUTAMI H., Inui S., Sato R., Kishimoto T.: Molecular structure
of human lymphocyte receptor for IgE.
Cell 47: 657-665 1986

KLATZMAN D., Champagne C., Chamoret S., Hercent T., Gluckmann
J.C., Montagnier L.: T Lymphocyte T4 molecule behaves as the
receptor for human retrovirus LAV.
Nature 312: 767-771 1984

LEIDEN J. and Strominger J.: The generation of diversity of the
human T lymphocyte receptor β chain.
Proc.Natl.Acad.Sci. in press 1987

LIFSON J.D., Feinberg M.B., Reyes G.R., Wong-Staal F., Steiner
K.S., Egleman E.G.: Induction of CD4 dependent cell fusion by the
HTLV III/LAV envelope glycoprotein.
Nature 323: 725-729 1986

MADDON P.J., Littman D.R., Godfrey M., Maddon D.E., Chess L.,
Axel R.: The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding
the T cell surface protein T4.
Cell 42: 93-104 1985

MAXAM A.M. and Gilbert W.: A new method for sequencing DNA.
Proc.Natl.Acad.Sci. 74: 560-564 1977

MAXAM A.M. and Gilbert W.: Sequencing end labelled DNA with base-
specific chemical cleavages.
Methods Enzymol. 65: 499-505 1980

McMICHAEL A.J.: HLA- restriction of cell mediated lympholysis of
influenza virus infected human cells.
Nature 270: 524-526 1974

MELCHERS F. and Rajewsky K.: The immune response.
27. Colloquium Mosbach 1976
Berlin, Heidelberg, New York. Springer 1976

METROKA C.E. and Poser J.B.: Neurological complications of AIDS:
analysis of 50 patients.
Ann.Neurol. 14: 413-417 1983

MEUER S.C., Fitzgerald K.A., Hussey R.E., Hodgdon J.C.,
Schlossman S.F., Reinherz E.C.: Clonotypic structures involved in
antigen specific human T cell function.
J.Exp.Med. 157: 705-719 1983

- MEUER S.C., Acuto O., Hercent T., Schlossman S.F., Reinherz E.L.:
The human T cell receptor.
Ann.Rev.Immunol.2: 23-50 1984
- MILLER J.F.: Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse.
Proc.roy.Soc.B. 156: 415-421 1962
- NEEFJES J.J., Hensen E.J., deKroon T.I.P., Ploegh H.L.: A biochemical characterisation of feline MHC products.
Immunogenetics 23: 341-348 1986
- NEIDT G.W., Schinella R.A.: AIDS: clinicopathologic study of 56 patients.
Arch.Path.Lab.Med. 109: 727-734 1985
- OHNO S., Matsumas T., Epplen J.T., Itakura K., Wallace R.B.: Identification of a 45- base- long primordial building block of the entire class I MHC antigen gene.
PNAS 79: 6342-6346 1982
- OKAYAMA H. and Berg P.: High efficiency cloning of full- length cDNA.
Mol.Cell.Biol. 2: 161-172 1982
- PARNES J.R.: T- cell differentiation antigens: Proteins, Genes and Function
Bio- Essays 4: 255-262 1986
- PERT C.B., Hill J.M., Ruff M.R., Berman R.M., Robey G., Arthur L.O., Ruscetti F.W., Farrar W.L.: Octapeptides deduced from the neuropeptide receptor-like pattern of antigen T4 in brain potentially inhibit human immunodeficiency virus receptor binding and T cell infectivity
Proc.Natl.Acad.Sci. 83: 9254-9258 1986
- PLOEGH H.L., Orr H.T., Strominger J.L.: Major histocompatibility Antigens: the human and murine class I molecules.
Cell 24: 287-299 1981
- PERNIS B. und Axel R.: A one and a half receptor model for MHC restricted antigen recognition by T Lymphocytes.
Cell 41:13-16 1985
- RIEBER P. und Riethmüller G.R.: Loss of circulating CD4 positive monocytes in patients infected with HTLV III.
The Lancet Feb. 1986
- ROBERTSON H.D., Branch A.D., Dahlberg J.E.: Focusing on the nature of the Scrapie agent.
Cell 40: 725-729 1985
- TOURVIELLE B., Gorman S.D., Field E.H., Hunkapiller T., Parnes J.R.: Isolation and sequence of L3T4 cDNA clones: expression in T cells and brain.
Science 234: 610-616 1986
- SAMELSON L.E., Davidson W.F., Morse H.C., Klausner R.D.: Abnormal tyrosine phosphorylation on T cell receptors in lymphoproliferative disorders.
Nature 324: 674-681 1986

- SANGER F. and Carlson A.R.: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.
J.Mol.Biol. 94: 441-448 1975
- SANGER F. and Carlson A.R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitors.
Proc.Natl.Acad.Sci. 74: 5463-5469 1977
- SCHNEIDER C., Newman R.A., Sutherland D.R., Ushi A., Greaves M.F.: One step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix.
J.Biol.Chem. 257: 10766-10769 1982
- SCHWARTZ R.H.: T lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex.
Ann.Rev.Immunol. 3: 237-261 1985
- SCOPSI L., Larsson L.I.: Increased sensitivity in peroxylase immunochemistry.
Histochemistry 84: 221-228 1985
- SELIGMAN M., Chess L., Fahey J.L.: AIDS- an immunologic reevaluation
N.Engl.J.Med. 311: 1286-1292 1984
- SHAW G.M., Harper E.M., Hahn B.H., Wong-Staal F., Gallo R.C.: HTLV III infections of children and adults with AIDS encephalopathy.
Science 227: 177-182 1985
- SIMS J.E., Tunnacliff A., Smith W.J., Rabbits T.H.: Complexity of human T cell antigen receptor β chain constant and variable region genes.
Nature 312: 541-544 1984
- SODROSKI J., Goh W.C., Rosen C., Campbell K., Haseltine W.A.: Role of the HTLV III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity.
Nature 322: 470-474 1986
- STANFORD J.S., Junidiro F., Levy R.: Human T cells and monocytes bear the same Leu 3 (CD4) antigen.
J.Immunol. 136: 3773-3778 1986
- STROYNOWSKY I., Korber B., Soloski M., Mann D., Forman J., Hood L.: Regulation of murine class I antigen expression
5th HLA and H-2 cloning workshop, Les Avants, 1986 p (90)
- ULLRICH A., Shine J., Chirgwin R., Goodman H.M.: Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences.
Science 196: 947-953 1977

WILLIAMS A.F., Gagnon J.: Neuronal cell Thy- 1 glycoprotein: homology with immunoglobulin.
Science 216: 696-700 1982

WILLIAMS D.L., Look A.T., Melvin S.L., Roberson P.K.: New chromosomal aberrations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia.
Cell 36: 101-107 1984

YANAGI Y., Yoshikai Y., Leggett K., Clark S.P., Aleksander I., Mak T.: A human T cell specific cDNA clone that encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains.
Nature 308: 145 1984

YANCOPOULOS G., Blackwell T.K., Suh H., Hood L., Alt F.W.: Introduced T cell receptor variable region gene segments in pre- B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase.
Cell 44: 251-259 1986

YOSHIKAI Y., Kimura N., Toyonaga B., Mak T.W.: Sequences and repertoire of human TCR chain variable region genes in mature T lymphocytes.
J.exp.Med. 164: 90-97 1986

YOSHIKAI Y., Anatoniou D., Clark S.P., Yanagi Y., Terhorst C., Mak T.W.: Sequence and expression of transcripts of the human T cell receptor β chain genes.
Nature 312: 521-524 1984

ZECH L., Hammarstrom L., Smith C.I.E.: Chromosomal aberrations in case of T - CLL.
Int.J.Cancer 32: 431-436 1983

ZINKERNAGEL R.M. und Doherty P.C.: Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes.
Nature 251: 547-548 1974

Verzeichnis der Abbildungen	Seite
Abb.1 Genomische Organisation der Immunglobuline	4
Abb.2 Der humane MHC (Organisation und Aufbau)	6
Abb.3 Modelle zur T- Zellantigenerkennung	7
Abb.4 Genomische Organisation der T Zellrezeptorgene	9
Abb.5 Die Immunglobulinsupergenfamilie	10
Abb.6 Der funktionelle T- Zellrezeptorkomplex	12
Abb.7 Kontrolle der T CLL RNS im Northernblot	17
Abb.8 Organisation der verwendeten TCR spezifischen Proben	20
Abb.9 Klonierstrategie und schematische Darstellung von pMF B4.3	22
Abb.10 Nukleotid und Aminosäuresequenz von pMF B4.3	23
Abb.11 Vergleich von D- Elementen der Betakette	25
Abb.12 Klonierstrategie und schematische Darstellung von pMF 3.2	27
Abb.13 Nukleotid und Aminosäuresequenz von pMF 3.2	28
Abb.14 Vergleich der Proteinsequenzen der V/D/J Bereiche	30
Abb.15 Southernblot mit V- Genproben	31
Abb.16 Northernblot mit V- und C- Genproben und Scanneranalyse	34
Tab.I Transkriptionshäufigkeiten der V- Gene	32
Abb.17 Northernblot mit TCR spezifischen Proben auf RNS von B- Zelllinien	36
Abb.18 Beschreibung und Lokalisation CD4 spezifischer Oligonukleotide	38
Abb.19 Westernblot mit anti CD4 monoklonalen Antikörpern auf B- Zelllinien	42
Abb.20 Northernblot mit einer CD4 spezifischen cDNS Probe auf RNS von B- Zelllinien	43
Abb.21 FACS Analyse mit anti CD4 FITC gekoppelten monoklonalen Antikörpern auf B- Zellen	44
Abb.22 Färbung von B- Zellen im SC- ELISA	46
Abb.23 Northernblot Analyse von B- Zellen mit CD4,	48

TCR und aktinspezifischen cDNA Proben

Abb.24 Analyse von Gliazelllinien im Northernblot	50
Abb.25 Analyse von RNS Präparationen aus Hirnsubarealen im Northernblot	52
Abb.26. Homologievergleich von V- Genteilsequenzen	60

DANKSAGUNG

Allen voran gilt mein Dank Frau Dr. Elisabeth Weiss für die vielen lebendigen Diskussionen. Durch ihre konstruktive Kritik hat Elisabeth in hohem Maße Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Meinen Kolleginnen und Kollegen im vierten Stockwerk danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die dort herrschende kreative und menschlich angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Ilona Funke für anregende miternächliche Diskussionen, sowie kollegiale und gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Cleve habe ich für die bereitwillige Übernahme der Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät zu danken.

Ich freue mich, daß Herr Prof. Winnacker das Sondergutachten übernommen hat und bin ihm hierfür zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Riethmüller habe ich nicht nur für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut, sondern auch für die bei der Durchführung der Experimente gewährten Freiräume, zu danken.

1. Die ...
 2. Die ...
 3. Die ...
 4. Die ...
 5. Die ...

Diese ...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

